

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON
Ecole Doctorale "Homme, Environnement, Santé"

ANNEE 2010 – N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Recherche Clinique, Innovation Technologique, Santé Publique

Présentée et soutenue publiquement

Le 26 novembre 2010

Présentée par

Pascal CHOLLEY

**Analyse génétique des souches multi-résistantes de
Pseudomonas aeruginosa dans l'Est de la France, apport
prédictif potentiel sur le risque infectieux.**

Directeur de thèse : Dr Daniel TALON

Jury

Pr Philippe BERTHELOT, Université Jean Monnet, Saint-Étienne	Rapporteur
Pr Anne-Marie ROGUES, Université Victor Segalen, Bordeaux	Rapporteur
Pr Jean FRENEY, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon	Examineur
Pr Xavier BERTRAND, Université de Franche-Comté, Besançon	Examineur
Dr Daniel TALON, Université de Franche-Comté, Besançon	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été financée dans le cadre d'un contrat CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche), entre le CHU Jean Minjot de Besançon et le laboratoire Chrono-Environnement. Les différents travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du service d'Hygiène Hospitalière.

Mes remerciements s'adressent, d'abord, à mon directeur de thèse, le Docteur Daniel Talon, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ce travail, dans son équipe de recherche et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à son bon déroulement. Je voudrais aussi le remercier pour son encadrement, pour ses encouragements et pour sa rigueur scientifique au quotidien durant ces années. Je ne saurais oublier aussi les conseils et la confiance que vous m'avez témoignés ainsi que les corrections qui m'ont permis d'aboutir à cette thèse.

Je remercie cordialement le Professeur Philippe Berthelot, de l'Université Jean Monnet à Saint-Étienne et le Professeur Anne-Marie Rogues, de Université Victor Segalen à Bordeaux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

C'est avec grand plaisir que je remercie le Professeur Jean Freney, de l'Université Claude Bernard à Lyon 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de présider ce jury.

Je remercie également le Professeur Xavier Bertrand, pour son implication, pour ses conseils scientifiques, pour son aide précieuse dans la rédaction des articles et enfin, pour sa disponibilité durant ces trois années. Encore merci, pour le temps passé sans compter à corriger ce manuscrit et de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à Michelle Thouverez dite « mimi » pour m'avoir formé au champ pulsé, dont tout le monde connaît toute sa complexité. Merci encore, pour tes précieux conseils dans les différents rouages de la biologie moléculaire, pour ta disponibilité et ton amitié durant ces années. Je te remercie aussi pour avoir pris du temps à relire ce travail.

Ma gratitude s'adresse aussi à ceux qui ont été tour à tour mes collègues et amis de bureau et/ou de paillasse. Merci Houssein pour ton aide pour les statistiques, tes conseils pour le MLST et surtout pour la formation « café », merci mais il ne fallait pas. Merci Céline, Marlène, Sophie pour la bonne ambiance dans le bureau. Merci Amélie, les internes Claire, JB, Stéphane, Caroline, les externes Catherine, Sébastien, Lyse, etc ... la liste est trop longue et enfin Pierre, Océane, les stagiaires pour avoir partagé des bouts de paillasses à mes côtés, en écoutant Radio Star. Encore merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Je tiens aussi à remercier également mes autres collègues et amis de boulot, Lucie, Pascale, Aurélie, Françoise, Lionel, Pierrette, Nathalie F, Edith, Marie-Caroline et sans oublier les infirmières Véronique, Catherine, Nathalie R pour leur accueil, les nombreuses discussions et pour leur bonne humeur.

Je souhaite remercier également Sylvain pour sa bonne humeur et pour les petites pauses café qui s'imposait, mais aussi Barbara, Marjorie, Damien et Didier pour la collaboration fructueuse avec le CNR et le laboratoire de Bactériologie. Je remercie également les filles de la laverie pour la préparation des milieux et leur bonne humeur au quotidien. Merci aussi, à l'ensemble des techniciens et des techniciennes du laboratoire de bactériologie et d'épidémiologie pour leur sympathie, mais surtout pour m'avoir facilité le recueil des souches bactériennes sans lesquelles ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je remercie aussi mes amis de la Fédération, Jenny, Steffi, Quentin ..., de passage ou pas, mes amis de Master, mes amis Thésard, mes amis de Fac, mes amis de l'association A'Doc, Samuel, Lyse, Maïté, Cécile, Aurélie, Adeline et toute la compagnie. Merci à mes amis de toujours Pierre, Cyril et Anthony pour y avoir cru et pour tout le reste.

Enfin, mes remerciements les plus forts vont pour mes parents, ma famille et mes proches pour votre irremplaçable et inconditionnel soutien. Mais surtout pour les encouragements, le soutien moral pour écarter les doutes et partager les joies. Pour votre confiance, mais surtout pour avoir cru à mes ambitions, car dans la vie, tout est possible. Cette thèse est là votre aussi.

Comme il ne m'est pas possible de citer toutes les personnes qui ont directement ou indirectement contribué à la réalisation de ce travail et que je souhaite éviter d'en oublier, je me permets de lancer un remerciement général à toutes celles et ceux qui se reconnaîtront dans ces lignes.

Les meilleures choses ont une fin et à cet instant en ce qui concerne ce manuscrit pour moi c'est fini. C'est donc avec une certaine émotion que je vous confie cet épisode passionnant de ma vie de thésard résumé dans ces quelques pages en souhaitant par-dessus tout qu'il vous soit utile.

Dans la vie, il y a trois facteurs : le talent, la chance, le travail.
Avec deux de ses facteurs, on peut réussir.
Mais l'idéal est de disposer des trois.

(de Bernard Werber)

Je dédie cette thèse.

à la mémoire de ma mère
à mon père
à mes frères et sœurs

à ma famille

Sommaire

SOMMAIRE	8
Liste des articles	14
Liste des abréviations	16
Liste des figures	17
Liste des tableaux	18
INTRODUCTION	20
1^{ère} PARTIE : Etudes bibliographiques	24
1. Mécanismes de résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques	25
1.1. Résistances naturelles	25
1.2. Résistances acquises	26
1.2.1. Mécanismes de résistances aux β -lactamines	26
1.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC	27
1.2.1.2. Résistance par production de β -lactamases de classe A	28
1.2.1.3. Résistance par production de β -lactamases de classe D	30
1.2.1.4. Résistance par production de β -lactamases de classe B	30
1.2.1.5. Résistance des β -lactamines par efflux actif	30
1.2.1.6. Altération de la perméabilité membranaire	31
1.2.1.7. Modification des cibles cellulaires	31
1.2.2. Résistances aux fluoroquinolones	32
1.2.2.1. Résistance par altérations des cibles	32
1.2.2.2. Résistance par efflux actif	33
1.2.3. Résistances aux aminosides	33
1.2.3.1. Résistance par modification enzymatique	33
1.2.3.2. Résistance par modification de la perméabilité membranaire	34
1.2.3.3. Résistance par efflux actif	34
1.2.3.4. Résistance par modification de la cible ribosomale	34
1.2.3.5. Rôle de l'opéron <i>oprH-phoP-phoQ</i> dans la résistance aux aminosides	35
1.2.3.6. Rôle protecteur de l'alginate ou du biofilm	35

2. Epidémiologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.1. Réservoirs et vecteurs.....	36
2.2. Données épidémiologiques	37
2.2.1. Epidémiologie des infections	37
2.2.2. Incidence de <i>P. aeruginosa</i> dans les unités de soins intensifs	39
2.2.3. Epidémiologie de la résistance	40
2.3. Emergence et diffusion de la multi-résistance	42
2.3.1. Acquisition de la multi-résistance	42
2.3.2. Prévention de l'émergence de la multi-résistance	44
2.4. La mucoviscidose.....	46
2.5. Thérapeutique.....	46
2^{ème} PARTIE : Matériel et méthodes	48
1. Souches bactériennes étudiées	49
2. Identification des souches	49
3. Techniques de biologie moléculaire.....	50
3.1. Isofocalisation (IEF)	50
3.1.1. Principe.....	50
3.1.2. Mode opératoire	51
3.2. Identification des β -lactamases par PCR.....	52
3.2.1. Principe.....	52
3.2.2. Mode opératoire	53
3.3. Electrophorèse en champ pulsé	55
3.3.1. Principe.....	55
3.3.2. Mode opératoire	56
3.4. Multi-locus séquence type.....	59
3.4.1. Principe.....	59
3.4.2. Mode opératoire	60
4. Analyse statistique	64

3^{ème} PARTIE : Travaux	66
1. Etude 1 - Plaidoyer en faveur du dépistage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les services de réanimation.	67
1.1. Présentation de l'étude	67
1.2. Résultats	67
1.3. Conclusion.....	68
1.4. Texte de l'article.....	68
2. Etude 2 - Place des points d'eau des chambres de réanimation comme réservoirs de contamination des patients par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
2.1. Présentation de l'étude	81
2.2. Résultats	81
2.3. Conclusion.....	82
2.4. Texte de l'article.....	82
3. Etude 3 – Epidémiologie moléculaire des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistantes dans un hôpital universitaire Français.	89
3.1. Présentation de l'étude	89
3.2. Résultats	89
3.3. Conclusion.....	90
3.4. Texte de l'article.....	90
4. Etude 4 – Epidémie hospitalière de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productrice d'une oxacilline à spectre étendu de type OXA-19.	95
4.1. Présentation de l'étude	95
4.2. Résultats	96
4.3. Conclusion.....	96
4.4. Texte de l'article.....	96

5. Etude 5 – Détection d’une nouvelle oxacillinase à spectre étendu chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
5.1. Présentation de l’étude	101
5.2. Résultats	101
5.3. Conclusion.....	102
5.4. Texte de l’article.....	102
6. Etude 6 – La majorité des souches multi-résistantes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées des hôpitaux de l’Est de la France appartiennent à quelques types clonaux.....	105
6.1. Présentation de l’étude	105
6.2. Résultats	106
6.3. Conclusion.....	106
6.4. Texte de l’article.....	106
7. Etude 7 – Modélisation multiniveau de la prévalence des patients infectés par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les établissements de santé de l’Est de la France.	121
7.1. Présentation de l’étude	121
7.2. Résultats	122
7.3. Conclusion.....	122
7.4. Texte de l’article.....	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	132
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	138

Liste des articles

Articles publiés

- 1 • Pascal Cholley, Michelle Thouverez, Nathalie Floret, Xavier Bertrand, and Daniel Talon. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 1428–1433.

- 2 • Houssein Gbaguidi-Haore, Michelle Thouverez, Gérard Couetdic, Pascal Cholley, Daniel Talon, Xavier Bertrand. Usefulness of antimicrobial resistance pattern for detecting PVL- or TSST-1-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a French university hospital. *J Med Microbiol.* 2009 ; 58:1337-40.

- 3 • Damien Fournier, Didier Hocquet, Barbara Dehecq, Pascal Cholley, Patrick Plésiat. Detection of a New Extended-Spectrum Oxacillinase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2010; 65:364-365.

- 4 • Pascal Cholley, Didier Hocquet, Corentine Alauzet, Aurélie Cravoisy-Popovic, Daniel Talon, Nejla Aissa, Patrick Plésiat, Xavier Bertrand. Hospital outbreak of *P. aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. *J Med Microbiol.* 2010; 59:866-9.

- 5 • Pascal Cholley, Houssein Gbaguidi-Haore, Xavier Bertrand, Michelle Thouverez, Didier Hocquet, Patrick Plésiat, Daniel Talon. Molecular epidemiology of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *J Hosp Infect.* 2010; 76:316-9.

- 6 • Houssein Gbaguidi-Haore, Pascal Cholley, Christian Rabaud, Xavier Bertrand, Daniel Talon. Multilevel modelling of the prevalence of hospitalized patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Epidemiol Infect.* 2010; 16:1-9.

Articles soumis :

1 • Céline Slekovec, Pascal Cholley, Michelle Thouverez, Xavier Bertrand, Daniel Talon. Plaidoyer en faveur du dépistage de *Pseudomonas aeruginosa* dans les services de réanimation. Pathol Biol.

2 • Pascal Cholley, Michelle Thouverez, Didier Hocquet, Nathalie van der mee-Marquet, Daniel Talon, Xavier Bertrand. The majority of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belongs to a few clonal types. J Hosp Infect.

3 • Pascal Cholley, Céline Slekovec, Marlène Sauget, Amélie Varin, Laurent Mourot, Lionel Pazart, Xavier Bertrand, Daniel Talon. Role of essential oils in limiting aerial diffusion of multiresistant bacteria in chronic pain care: results of an exploratory phase. Phytotherapy research.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
BLSE	β -lactamase à spectre étendu
BMR	Bactérie multirésistante
C3G	Céphalosporinase de 3 ^{ème} génération
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI	Concentration minimale inhibitrice
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
IAS	Infections associées aux soins
IN	Infection nosocomiale
MLST	MultiLocus Sequence Typing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PT	Pulsotype
ST	Sequence type

Liste des figures

Figure 1. Antibiogrammes de la souche sauvage de référence PAO1	25
Figure 2. Structure générale des β -lactamines.....	26
Figure 3. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine	32
Figure 4. Antibiogramme d'un isolat clinique toto-résistant par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton.....	45
Figure 5. Carte géographique de l'inter-région Est (8,5 millions d'habitants soit environ 14% de la population française	49
Figure 6. Amplification d'une séquence par PCR.....	52
Figure 7. L'électrophorèse en champ pulsé, mode opératoire (A) et photo d'un gel (B)	56
Figure 8. Photo d'un gel de contrôle des produits de PCR	62
Figure 9. Schéma récapitulatif de la technique de Multi Locus Sequence Typing.....	63

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations minimales inhibitrices de sept β -lactamines chez différents mutants délétés.	28
Tableau 2. Principales β -lactamases produites par <i>P. aeruginosa</i>	29
Tableau 3. Part relative de <i>P. aeruginosa</i> par catégories d'établissements de santé d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006.....	38
Tableau 4. Part relative de <i>P. aeruginosa</i> par type de séjour, d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006.	38
Tableau 5. Prévalence des infections nosocomiales relatives à <i>P. aeruginosa</i> , d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006.	39
Tableau 6. Incidence des colonisations/ infections dans les unités de soins intensifs en Europe.....	40
Tableau 7. Pourcentages de souches de <i>P. aeruginosa</i> sensibles en France d'après plusieurs enquêtes.....	41
Tableau 8. Pourcentages de souches de <i>P. aeruginosa</i> sensibles sur les différents continents d'après plusieurs enquêtes.	41
Tableau 9. Tableau de référence avec les points isoélectriques des souches témoins de <i>P. aeruginosa</i>	51
Tableau 10. Tableau réactionnel de préparation des Mix pour la l'identification β -lactamases par PCR.....	53
Tableau 11. Tableau récapitulatif des programmes PCR pour les différentes β -lactamases.	54
Tableau 12. Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générés par PFGE (d'après Tenover <i>et al</i>).	58
Tableau 13. Caractéristiques des 7 loci utilisés en Multi Locus Sequence Typing.	60
Tableau 14. Amorces de séquençage de référence pour le typage par MLST de <i>P. aeruginosa</i>	61

Introduction

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est un bacille à Gram négatif. Il a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Au cours des dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* s'est imposé comme un pathogène hospitalier très important du fait du nombre et de la gravité des infections causées. L'enquête nationale de prévalence de 2006 attribue à *P. aeruginosa* la responsabilité de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales en France, le plaçant ainsi au 3^{ème} rang des espèces isolées juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste, capable de s'adapter à de nombreux environnements. On le rencontre à l'état saprophyte dans les sols humides, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces, usées et marines (1). C'est une bactérie indépendante de l'homme mais elle peut être commensale du tube digestif. Le portage du bacille pyocyanique est peu fréquent chez les sujets en bonne santé, avec seulement 2 à 10 % de porteurs, tandis que chez les sujets hospitalisés ce taux peut atteindre 50 %, voire 60 % chez les sujets immunodéprimés (2, 3).

En milieu hospitalier, les services de soins intensifs sont des unités à potentiel endémique élevé pour cette bactérie, qui est à l'origine de 18 % des infections nosocomiales contre seulement 6 % dans les services de médecine et de chirurgie (4). *P. aeruginosa* joue ainsi un rôle majeur dans les infections broncho-pulmonaires et à un degré moindre dans les infections urinaires, les infections du site opératoire et les bactériémies. La gravité et la surmortalité observées au cours des infections liées au bacille pyocyanique sont dues à ses propriétés intrinsèques, à sa capacité d'adaptation vis-à-vis de son environnement, sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et antiseptiques et enfin, à sa capacité d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance (5).

Le fait le plus inquiétant de ces dernières années est le signalement de plus en plus fréquent de souches de *P. aeruginosa* résistantes à un nombre croissant d'antibiotiques et même dans certains cas de souches totalement résistantes à l'ensemble des molécules disponibles, mis à part la colistine. Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à l'imminence de l'ère "post-antibiotique" (6-8).

L'émergence et la diffusion de nouveaux mutants de *P. aeruginosa* de plus en plus résistants chez les patients en cours de traitement sont autant de facteurs pouvant conduire à l'échec thérapeutique. Pour faire face à ce défi que constituent ces bactéries émergentes, les établissements de santé doivent mettre en place des stratégies de surveillance et de contrôle. Ces actions impliquent une collaboration pluridisciplinaire associant des infectiologues, des microbiologistes, des hygiénistes et des épidémiologistes.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'épidémiologie hospitalière de *P. aeruginosa* et notamment à celle des souches multi-résistantes en utilisant divers outils de biologie moléculaire. L'ensemble des travaux avait pour but de caractériser l'épidémiologie de cette bactérie dans notre hôpital et dans l'inter-région Est. L'identification des mécanismes de résistance impliqués et la recherche des souches cliniques dans l'environnement hospitalier devait également nous permettre d'émettre des hypothèses sur l'origine de la colonisation des patients et des modes de diffusion de la résistance, afin de proposer des choix prioritaires parmi les mesures à mettre en œuvre pour la prévention des infections nosocomiales à *P. aeruginosa*.

La première partie de ce document présentera une synthèse bibliographique sur les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et sur les données épidémiologiques de *Pseudomonas aeruginosa*. Puis, dans une seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés avant d'exposer les résultats de notre travail.

Synthèse bibliographique

1. Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

1.1. Résistances naturelles

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate, et d'une mauvaise perméabilité membranaire. *P. aeruginosa* est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération et aux quinolones de première génération. *P. aeruginosa* est aussi généralement résistant à la kanamycine (9). A ces différents mécanismes, se surajoute le système d'efflux actif MexAB-OprM, produit constitutivement chez les bactéries sauvages, et qui joue un rôle fondamental dans la résistance naturelle à de nombreux agents toxiques ou antibiotiques dont les β -lactamines (10) et les aminosides (11). Il a toujours été considéré comme un micro-organisme difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques (12). *P. aeruginosa* n'est sensible naturellement qu'à un nombre restreint d'antibiotiques (Figure 1).

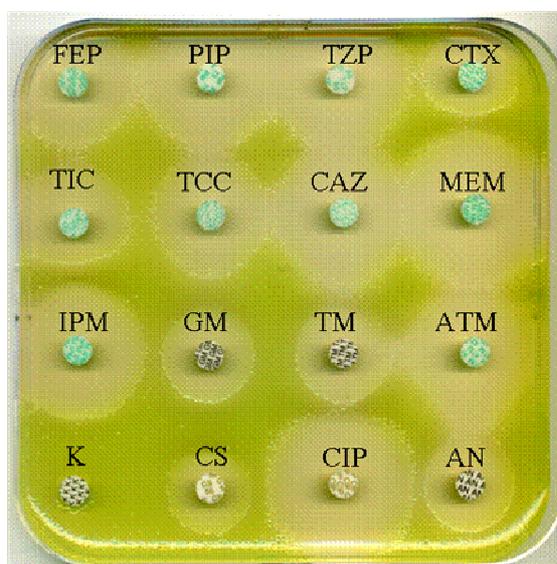


Figure 1. Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1.

FEP, Céfépime ; PIP, Pipéracilline ; TZP, Pipéracilline/Tazobactam ; CTX, Céfotaxime, TIC, Ticarcilline, TCC, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; CAZ, Ceftazidime ; ATM, Aztréonam. ; IPM, Imipénème ; GM, Gentamicine ; TM, Tobramycine ; K, Kanamicine ; CS, Colistine ; CIP, Ciprofloxacine ; AN, Amikacine.

1.2. Résistances acquises

1.2.1. Mécanismes de résistances aux β -lactamines

Les antibiotiques de la classe des β -lactamines constituent une vaste famille de molécules qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les pénèmes et les monobactames. Ces antibiotiques, caractérisés par la présence d'un noyau β -lactame (Figure 2), sont actuellement les plus utilisés en thérapeutique en raison de leur large spectre d'activité et de leur action bactéricide rapide sur les bactéries sensibles.

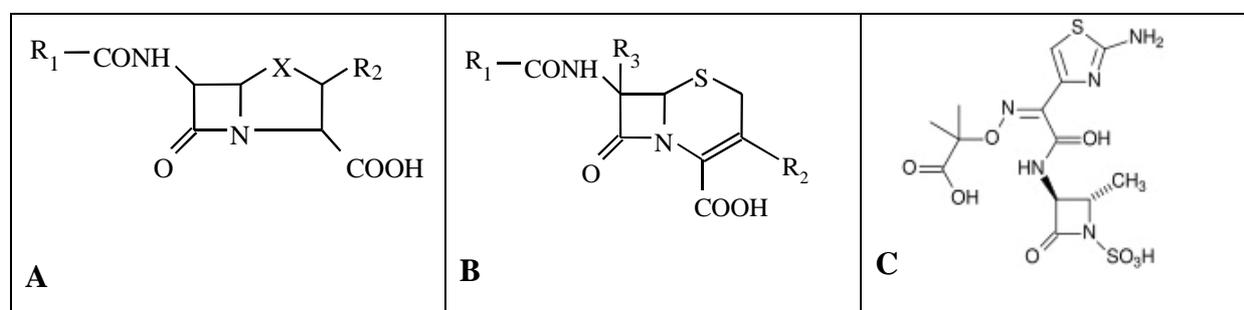


Figure 2. Structure générale des β -lactamines.

(A) Pénames, X=S ; Pénèmes, X=C ;

(B) Céphèmes, $R_3 = H$;

(C) Aztréonam (Monobactame),

La résistance aux β -lactamines peut impliquer la surexpression constitutive du gène *ampC* codant la β -lactamase, l'acquisition d'une β -lactamase extrinsèque, la surproduction d'un système d'efflux actif ou un déficit en porine OprD (13).

À ce jour, les β -lactamases sont réparties en quatre classes (A-D) selon la classification d'Amblar. Cette classification est la plus utilisée en pratique médicale, elle tient compte des analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique, ainsi que du profil d'inhibition. Les enzymes de classe A, C et D possèdent une sérine dans leur site catalytique alors que celles de classe B sont actives en présence de zinc.

1.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Amblar, ce sont des sérine-enzymes. Le mécanisme le plus fréquent est une hyperproduction constitutive de l'AmpC. La surproduction constitutive de l'enzyme AmpC affecte principalement l'activité de la ticarcilline, de l'association pipéracilline-tazobactam, de la ceftazidime, de l'aztréonam et dans une moindre mesure du céfépime. Habituellement, l'enzyme est produite en petites quantités, toutefois, la production de AmpC chez *P. aeruginosa* peut augmenter de 100 à 1000 fois (14). L'hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC permet *P. aeruginosa* de résister à toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Son action échappe à l'action des inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique ou le tazobactam. Le niveau de résistance est en relation avec la quantité d'enzyme AmpC produite (10). La cinétique d'hydrolyse n'est pas le reflet direct de l'activité enzymatique. En effet, l'efficacité de AmpC dépend, à la fois, de la perméabilité de la membrane externe et de l'efflux des molécules d'antibiotiques (15).

Les β -lactamases chromosomiques sont codées par le gène *ampC* (16). La régulation d'*ampC* est sous la dépendance d'un système de régulation avec en particulier les gènes *ampR*, *ampD* et *ampG*. Le gène *ampR* correspond à un activateur transcriptionnel du gène *ampC* qui est inductible en présence de β -lactamines et qui est réprimé par la protéine codée par le gène *ampD*. Le gène *ampG* code une protéine transmembranaire qui agit comme une perméase pour les 1,6-anhydromurapeptides, qui sont considérées comme des molécules signal impliquée dans l'induction de *ampC* (17).

Récemment, il a été démontré que deux autres gènes, *ampDh2* et *ampDh3*, interviennent dans la surexpression d'*ampC*. Le système de régulation de l'expression du gène *ampC* varie en fonction de l'altération en cascade ou non des gènes *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3* (Tableau 1) (18). Contrairement aux entérobactéries, il n'a pas encore été trouvé chez *P. aeruginosa* de céphalosporinases plasmidiques (19).

Tableau 1. Concentrations minimales inhibitrices de sept β -lactamines chez différents mutants délétés (18).

Souches	CMI (mg/L)						
	CAZ	FEP	TIC	PIP	ATM	IMP	MEM
PAO1	1	1	12	2	1	1,5	0,38
PAO1 Δ <i>ampD</i>	8	4	32	64	6	2	1
PAO1 Δ <i>ampDh2</i>	0,75	1	8	1,5	1	1	0,38
PAO1 Δ <i>ampDh3</i>	1	1	12	3	1,5	1	0,38
PAO1 Δ <i>ampDh2</i> + Δ <i>ampDh3</i>	0,75	1	6	2	0,5	1,5	0,38
PAO1 Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh2</i> *	12	12	256	48	16	1	0,38
PAO1 Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh3</i> *	48	32	>256	>256	16	1,5	2
PAO1 Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh2</i> + Δ <i>ampDh3</i>	48	32	>256	>256	24	1,5	2

Caz, Ceftazidime ; Fep, Céfépime; Tic, Ticarcilline ; Pip, Pipéracilline ; Atm, Aztréonam ; Imp, Imipénème ; Mem, Méropénème.

* combinaisons de mutations retrouvées chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa*.

1.2.1.2. Résistance par production de β -lactamases de classe A

-Pénicillinases

On distingue dans la classe A, les pénicillinases et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les pénicillinases, sont décrites PSE-1 (pour *Pseudomonas* specific enzyme) encore dénommée CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-3 et CARB-4 (20). Toutefois, PSE-1 est la pénicillinase majoritaire (90% des cas). Ces enzymes sont étroitement liées, et ne diffèrent que par seulement 1 ou 2 acides aminés (15, 21). Ces pénicillinases hydrolysent les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et la cefsulodine, et sont inactives sur la ceftazidime et les carbapénèmes.

- β -lactamases à spectre étendu

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) hydrolysent non seulement les carboxypénicillines et les uréidopénicillines, mais aussi les céphalosporines (ceftazidime, céfépime, céfpirome cefpirome et l'aztréonam) (22). L'activité *in vitro* est inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam (23). En plus des BLSE de type TEM et SHV qui sont largement décrites chez les entérobactéries, d'autres BLSE ont été identifiées chez *P. aeruginosa* : PER-1, VEB (1a, 1b, 2), GES (1, 2, 5, 8, 9), BEL-1, KPC.

Tableau 2. Principales β -lactamases produites par *P. aeruginosa* (22, 24-26).

Classification d'Amblar	Groupe	Enzymes
Classe A / pénicillinase	PSE	PSE-1, 3 à 5 ; CARB-3, 4
	TEM	TEM-1, 2, 4, 21, 24, 42, 45
	SHV	SHV-2a, 5, 12
	Autres	PER-1 ; VEB-1a, 1b, 2 ; GES-1, 2 ; IBC-2
Classes B / carbapénémases		<u>IMP-1, 7, 9 ; VIM-1 à 4</u>
Classes C / céphalosporinases		AmpC
Classes D / oxacillinases	I	OXA-5, 7, 10 (PSE-2), 11, 13, 14 à 17, 19, 28, 35, 45
	II	OXA-2, 3, 15, 20, 32, 34, 36, 53
	III	OXA-1, 4, 3031
	IV	OXA-9
	V	LCR-1, NPS-1

Les β -lactamases à spectre étendu sont notées en gras et les métalloenzymes sont soulignées.

Entre 1992 et 1998, plusieurs souches de *P. aeruginosa* productrices de TEM ont été isolées en France : TEM-42 (27), TEM-4 (28) , TEM-21 (29) et TEM-24 (30). Ces BLSE ont un spectre d'activité équivalent à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (C3G et aztréonam). SHV-2a a été détectée en France en 1995 (31), et plus tard en Thaïlande et en Pologne (32). PER-1 a été identifiée dans les urines d'un patient d'origine turque (33). PER-1, VEB-1 et GES-1 hydrolysent toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (22).

La diffusion des gènes de classe A des BLSE joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques, et peut limiter ainsi les possibilités de traitement des infections causées par *P.aeruginosa*.

1.2.1.3. Résistance par production de β -lactamases de classe D

Les oxacillinases de la classe D sont séparés en 5 groupes (Tableau 2). Les oxacillinases classiques, OXA-1, OXA-2, OXA-10, hydrolysent les carboxypénicillines et les uréidopénicillines mais sont inactives sur la ceftazidime. Par contre les oxacillinases à spectre étendu sont actives sur l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (24). L'activité de ces enzymes n'est pas inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam, sauf OXA-18 (24). La plupart des oxacillinases à spectre étendu sont codées par gènes présents sur des plasmides ou des intégrons, ce qui contribue à leur diffusion facile et à une augmentation de leur prévalence dans toute l'Europe (23).

1.2.1.4. Résistance des β -lactamases de classe B

Les enzymes de ce groupe sont également connues sous le nom de carbapénémases ou métallo- β -lactamases (MBL) en raison de la présence d'un ou de deux atomes de Zn^{2+} dans leur centre actif pour hydrolyser les β -lactamines (23). Seul le monobactam est épargné par les caractéristiques hydrolytiques des MBL. L'activité enzymatique des carbapénémases n'est pas inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam, mais est supprimée par des chélateurs ioniques, par exemple, l'EDTA (25). Plusieurs types de MBL ont été décrits : IMP, VIM, SPM, GIM (Tableau 2) (34-38).

1.2.1.5. Résistance aux β -lactamines par efflux actif

L'efflux actif est un mécanisme qui entraîne une augmentation de la résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa*. Plusieurs protéines (OprM, OprJ et OprN) agissent en tant que composants actifs des systèmes d'efflux.

Ainsi, le système MexAB-OprM participe à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux β -lactamines et sa surexpression entraîne une faible augmentation de la résistance à cette famille d'antibiotiques, à l'exception de l'imipénème (39). Le système MexCD-OprJ n'affecte que la sensibilité aux céphalosporines zwitterioniques (céfépime et cefpirome), aux quinolones, aux macrolides, aux tétracyclines et au chloramphénicol (40). Le dernier système d'efflux est le système MexEF-OprN qui augmente la résistance aux carbapénèmes, surtout à l'imipénème (41).

1.2.1.6. Altération de la perméabilité membranaire

Le déficit en porine OprD, protéine de la membrane externe empruntée spécifiquement par l'imipénème pour franchir la membrane externe de *P. aeruginosa*, se traduit par une imperméabilité membranaire. La réduction de l'expression de cette porine conduit à une baisse modérée de l'activité de tous les carbapénèmes. Ainsi, seule la résistance à l'imipénème est exclusivement dépendante du niveau de production d'OprD (42). Sur le plan clinique, on observe une sélection plus fréquente de souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème que pour le ceftazidime et la pipéracilline (39).

1.2.1.7. Modification des cibles cellulaires

Ce mécanisme de résistance implique cette fois-ci la modification des cibles cellulaires des β -lactamines, les protéines liant la pénicilline (PLPs), enzymes nécessaires à la synthèse d'un élément essentiel de la paroi bactérienne, le peptidoglycane (43). La sous-expression comme la surproduction de certaines PLP, la production de PLP altérées dont l'affinité pour les antibiotiques est réduite peut conférer aux bactéries une résistance sélective aux β -lactamines. La dégradation de la PLP-4 serait responsable d'une augmentation de la résistance à l'imipénème et la PLP-3 augmenterait la résistance à l'aztréonam, au céfépime, à la ceftazidime et au cefsulodin (44).

1.2.2. Résistances aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse à pouvoir bactéricide rapide comme la ciprofloxacine (Figure 3). Ces antibiotiques ont pour cibles les topoisomérases bactériennes de type II : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Chacune de ces enzymes est formée de 2 sous-unités, GyrA et GyrB, ParC et ParE, respectivement.

Malgré leurs grandes homologues de structure et de séquences protéiques, ces deux enzymes assurent des fonctions distinctes mais cruciales pour le maintien de la topologie de l'ADN. L'action bactéricide des fluoroquinolones résulte du blocage de la progression des ADN et ARN-polymérase (45). La résistance aux fluoroquinolones chez *P.aeruginosa* est due à la présence de mutation dans les Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR), des gènes codant les cibles et à la surexpression de systèmes d'efflux (46, 47).

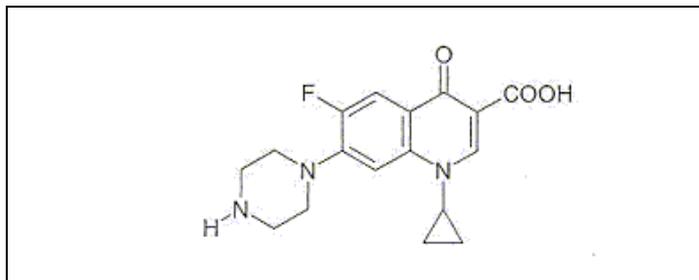


Figure 3. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine

1.2.2.1. Résistance par altérations des cibles

Les mutations dans les Quinolone Resistance-Determining Region des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles (46). Chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous-unités GyrB et ParC est peu fréquente, elle conduit à une résistance modérée aux fluoroquinolones (47). Par contre, les mutations dans le gène *gyrA* sont plus fréquentes et sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de la ciprofloxacine (CMI de 1 à 64 mg/L) (48). Toutefois, si les souches présentant une mutation du gène *parC* sont rares (49), l'association de mutations à la fois dans *gyrA* et *parC* conduit à de très hauts niveaux de résistance (CMI 128 mg/L) (48). Les mutations des gènes *gyrB* et *parE* semblent peu fréquentes et entraînent une résistance modérée aux fluoroquinolones (48, 50).

1.2.2.2. Résistance par efflux actif

Chez *P. aeruginosa*, la surexpression de la pompe MexAB/OprM, et la dérégulation des systèmes MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM provoquent une augmentation des CMI de la ciprofloxacine. Les souches cliniques résistantes aux fluoroquinolones (CMI de la ciprofloxacine > 2 mg/l) associent une surexpression d'un ou de plusieurs systèmes d'efflux avec des mutations cibles (49, 51, 52). En absence de mutation cible, la surexpression des pompes d'efflux est associée à une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones. Chez les bactéries sauvages, le système MexEF-OprN réprimé ne participe pas à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* (53-55). Ainsi le mode de résistance aux fluoroquinolones est variable suivant l'origine de la souche.

1.2.3. Résistances aux aminosides

Les aminosides sont des agents antibactériens naturels produits par les actinomycétales des genres *Streptomyces* et *Micronospora*. La modification par voie chimique de ces sucres aminés permet d'obtenir des dérivés hémisynthétiques (amikacine, arbékacine...) présentant une plus faible toxicité et une meilleure activité intrinsèque. L'action des aminosides repose principalement sur la capacité à inhiber la synthèse protéique en bloquant l'action ribosomale aux différents stades de la traduction, ou encore en introduisant des erreurs dans la synthèse peptidique (56).

1.2.3.1. Résistance par modification enzymatique

Le mécanisme majeur de la résistance aux aminosides repose sur la modification enzymatique de certains groupements chimiques de ces antibiotiques. Trois classes d'enzymes ont été décrites chez *P. aeruginosa* : les N-amino-acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des fonctions $-NH_2$, les O-phosphotransférases (APH) et les O-nucléotidyltransférases (ANT) qui permettent respectivement la phosphorylation et la nucléotidylation des fonctions $-OH$ (57). La modification des AAC participe à la résistance de cette espèce à la plupart des aminosides utilisés en thérapeutique (gentamicine, tobramycine, nétilmicine et amikacine) (58).

Pour les APH le niveau de résistance du bacille pyocyanique augmente pour la kanamycine et la néomycine (59). Enfin, les ANT confèrent une résistance à la streptomycine, la spectinomycine, la gentamicine et la tobramycine (60, 61).

1.2.3.2. Résistance par modification de la perméabilité membranaire

Les lipopolysaccharides bactériens sont des composants de la membrane externe. Un défaut de charge négative au niveau du lipopolysaccharide réduit la pénétration intracellulaire des aminosides. Chez les souches cliniques, l'altération de différents gènes impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides comme le locus *rfb* conduit au phénotype « *rough* » (aspect sec et rugueux), s'accompagnant parfois d'une baisse modérée de la sensibilité à l'ensemble des aminosides (62, 63).

La modification des lipopolysaccharides est un phénomène fréquent chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose (64). Ceci a été également observé chez des souches isolées de patients présentant des brûlures surinfectées et traitées localement par la gentamicine (65).

1.2.3.3. Résistance par efflux actif

Chez *P. aeruginosa*, seul le système d'efflux actif MexXY (OprM) est capable d'exporter les aminosides vers le milieu extérieur et d'entraîner une résistance à cette famille d'antibiotiques (66). Naturellement réprimé chez les souches sauvages, ce système peut être surproduit chez certains mutants. Lorsque ces mutations surviennent, la surexpression constitutive de l'opéron mexXY qui en résulte entraîne une résistance modérée aux aminosides (CMI augmentées d'un facteur 2 à 8 par rapport à la souche de référence PAO1) mais également aux fluoroquinolones et au céfépime (67).

1.2.3.4. Résistance par modification de la cible ribosomale

La méthylation de l'ARNr 16S a récemment émergé comme un nouveau mécanisme de la résistance aux aminosides parmi les agents pathogènes à Gram négatif y compris *P. aeruginosa* (68).

Le gène *rmtA*, qui code une méthylase de l'ARNr 16S, similaire à celle produite par les actinomycètes, procure à la bactérie une résistance de haut niveau à l'amikacine, la tobramycine, l'isépamicine, la kanamycine, l'arbekacine et la gentamicine (69). La résistance bactérienne aux aminosides peut également résulter de mutations des gènes codant l'ARNr 16S du site A du ribosome (70).

Toutefois, il faut souligner que la résistance par mutation du gène codant l'ARNr 16S n'est efficace que chez les bactéries possédant une ou éventuellement deux copies des gènes de l'ARNr 16S. Mais *P. aeruginosa* possède quatre copies de ce gène, ainsi la probabilité qu'elles soient affectées toutes les quatre par des mutations identiques est très faible et la résistance par ce mécanisme est peu probable. La dernière cible est l'altération des protéines ribosomales mais cette résistance est relativement rare (71).

1.2.3.5. Rôle de l'opéron *oprH-phoP-phoQ* dans la résistance des aminosides

Le gène *oprH* se trouve associé dans un même opéron aux gènes *phoP* et *phoQ* qui codent un système de transduction du signal. La surexpression de la protéine de membrane externe OprH a été observée chez des souches mutantes de *P. aeruginosa* présentant une résistance élevée à la polymyxine et modérée à la gentamicine. Il semblerait que le système PhoP-PhoQ intervienne indirectement dans la résistance aux aminosides et à la polymyxine B. Ainsi, il a été observé au niveau de différents mutants de *P. aeruginosa* affectés dans les gènes *phoP* ou *phoQ* une légère augmentation de la résistance à la streptomycine, la kanamycine et l'amikacine (72).

1.2.3.6. Rôle protecteur de l'alginate ou du biofilm

La formation d'un biofilm, ou la production d'une quantité massive d'alginate (polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique) par les souches de *P. aeruginosa* créent une barrière permettant aux bactéries de persister et de se protéger des défenses immunitaires de l'hôte (73). Les polymères d'alginate sont produits par les souches dites « muqueuses » de *P. aeruginosa* isolées chez les patients atteints d'infections chroniques comme la mucoviscidose.

Les souches de *P. aeruginosa* vivant en biofilm peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes à la tobramycine, par exemple, que leurs homologues vivant à l'état planctonique (74). Une étude réalisée par Hoffmann *et al.* a mis en évidence que la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la streptomycine peuvent induire la formation de biofilm sans pour autant affecter la croissance bactérienne (75).

Cependant, la croissance bactérienne et la réduction de la pénétration des antibiotiques au sein du biofilm tendent à diminuer l'efficacité des aminosides (76). L'impact des biofilms sur la résistance aux antibiotiques semble malgré tout limité (77).

2. Epidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1. Réservoirs et vecteurs

Pseudomonas aeruginosa est un micro-organisme très répandu et capable de persister dans l'environnement. Il a la capacité d'utiliser différents composés organiques comme sources d'énergie et de survivre pendant de longues périodes, aussi longtemps que l'humidité sera suffisante. Le réservoir naturel et permanent de ce microorganisme hydrophile est représenté par les sols humides, les végétaux et surtout les eaux douces, usées et marines (1). Ainsi, les plantes et les légumes peuvent servir de réservoir pour *P. aeruginosa* et comme agent de diffusion (78).

Le bacille pyocyanique est indépendant de l'homme mais peut être commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Pour les sujets en bonne santé, *P. aeruginosa* est peu présent, avec seulement 2 à 10 % de porteurs, tandis que chez les sujets hospitalisés, ce taux peut atteindre 50 % voire 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres. Le milieu hospitalier peut être un habitat idéal pour ce micro-organisme. En effet, de nombreuses niches écologiques existent dans les hôpitaux, en particulier au niveau des points d'eau et des milieux humides, notamment au niveau des robinets et des siphons (79-82).

Le rôle de l'environnement dans la colonisation par *P. aeruginosa* des patients est une question clé. De nombreuses études attribuent un rôle majeur aux points d'eau sur l'incidence de la colonisation des patients dans les unités de soins intensifs (80, 82, 83). D'autres ont rapporté qu'un faible lien épidémiologique entre la présence de *P. aeruginosa* dans l'environnement et la survenue d'infections chez les patients (1, 81).

La présence d'une souche dans l'environnement peut être une simple conséquence de la colonisation du patient plutôt qu'une source d'acquisition. La contamination de l'eau du robinet par *P. aeruginosa* est en général une colonisation rétrograde.

Toutefois, *P. aeruginosa* peut aussi contaminer le matériel hospitalier, tel que les endoscopes (84-86), les nébulisateurs (87), les équipements de dialyse (88, 89), des analyseurs de gaz du sang (90) ou encore les bain-marie (91, 92). Ainsi de nombreuses épidémies hospitalières ont été imputées à la contamination de divers équipements et/ou matériels humides. Dans ce cas de figure, la bactérie est censée être transmise directement à partir du réservoir aux patients sans passer par aucun intermédiaire. Mais plusieurs études mettent en avant le personnel médical comme réservoir et vecteur potentiel de *P. aeruginosa*. C'est le cas, de Moolenaar et ses collègues qui ont décrit une épidémie liée à des ongles artificiels (93) et McNeil et ses collègues ont rapporté une épidémie liée à la colonisation chronique de l'ongle du pouce d'une infirmière (94). Cependant, cette voie de diffusion est moins fréquente que les voies habituelles.

2.2. Données épidémiologiques

2.2.1. Epidémiologie des infections

Aujourd'hui *Pseudomonas aeruginosa* joue un rôle important dans les infections associées aux soins (IAS), notamment chez les patients immunodéprimés ou immunocompétents bénéficiant de dispositifs invasifs (95, 96).

Le bacille pyocyanique est responsable de 10 % des IAS dans les hôpitaux en France (97). En milieu hospitalier, les services de soins intensifs sont des unités de forte endémicité pour le bacille pyocyanique, qui est à l'origine de 18 % des infections nosocomiales contre seulement 6 % dans les services de médecine et de chirurgie (98). Les tableaux 3, 4 et 5 montrent la part relative des infections nosocomiales causées par le bacille pyocyanique en fonction du type d'établissement de santé (Tableau 3), du type de services (Tableau 4) et enfin selon le site de l'infection (Tableau 5).

Tableau 3 : Part relative de *P. aeruginosa* par catégories d'établissements de santé, d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006 (99).

Type de ES	Nombre d'IN	Nombre d'IN liées à <i>P. aeruginosa</i>	Part des IN liées à <i>P. aeruginosa</i> (%)
CHR/CHU	4182	448	10.7
CH/CHG ≥ 300 lits	4253	447	10.5
CH/CHG < 300 lits	1625	150	9.5
CHS/ psy	281	22	7.8
Hôpital local	792	69	8.7
Clinique MCO ≥ 100 lits	1764	155	8.8
Clinique MCO < 100 lits	430	53	12.3
HIA	94	11	11.7
SSR/SLD	1925	183	9.5
CLCC	243	23	9.5
Autre	211	22	10.4
Total	15800	1583	10.0

Tableau 4 : Part relative de *P. aeruginosa* par type de séjour, d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006 (99).

Type de services	Nombre d'IN	Nombre d'IN liées à <i>P. aeruginosa</i>	Part des IN liées à <i>P. aeruginosa</i> (%)
médecine	4226	427	10.1
Court chirurgie	3592	338	9.4
Séjour obstétrique	180	3	1.7
réanimation	1762	271	15.4
SSR	4159	387	9.3
SLD	1557	136	8.7
Psychiatrie	292	19	6.5
Autre	32	2	6.3
Total	15800	1583	10.0

Tableau 5 : Part relative de *P. aeruginosa* par site infectieux, d'après l'enquête nationale de prévalence de 2006 (99).

Site infectieux	Nombre IN	Prévalence des IN associées (%)
Infection urinaire	131	7.6
Pneumopathies	355	20.6
Bactériémie/Septicémie	110	6.4
Infection site opératoire	155	9.0
Peau et tissu mous	266	15.4
Autre localisation	707	0,05
Total	1724	0,38

2.2.2. Incidence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les unités de soins intensifs

Le taux d'incidence des infections nosocomiales liées à *P. aeruginosa* est plus important dans les unités de soins intensifs que dans les autres services. A l'admission, environ 1 % (100) des patients est infecté par le bacille pyocyanique et ce taux tend à augmenter au cours de l'hospitalisation, pour atteindre entre 3 % (101) et 10 % (102). Les principales infections causées par *P. aeruginosa* en termes de fréquence, de morbidité et de mortalité sont les pneumopathies sous ventilation assistée (101, 103, 104). Les patients sont souvent colonisés par *P. aeruginosa* avant de développer une infection. Ainsi, les dépistages effectués chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs montrent que le taux de colonisation à l'admission varie entre 2 et 13 % des individus. Mais ce taux augmente au cours de la période d'hospitalisation entre 15 et 44 % (tableau 6). Pour les patients qui ne sont ni colonisés, ni infectés lors de l'admission, le risque de contracter *P. aeruginosa* est en corrélation avec l'utilisation de cathéters urinaires (105), la durée du séjour aux soins intensifs (106, 107), le traitement antibiotique (108, 109), les néoplasies (105).

Tableau 6 : Incidence des colonisations/ infections dans les unités de soins intensifs en Europe.

Auteurs	Incidence des colonisations/ infections pour 100 patients		
	A l'admission	En cours d'hospitalisation	Total
Bergmans (102)	4.4	17.6	22
Berthelot (101)	11.9	32.2	44.1
Bertrand (100)	4	12.1	16.1
Bonten (103)	13	22	35
Speijer (110)	10	15.6	25.6
Talon (106)	4.2	18.9	23.1

Enfin, la part relative des sources endogènes et exogènes liées à *P. aeruginosa* n'est pas clairement établie et varie entre deux unités de soins intensifs, mais aussi au sein d'un même service de soins intensifs en fonction de la période considérée. La situation générale semble être une succession de d'épidémies affectant trois à dix patients sur un fond de cas sporadiques, impliquant la transmission par le personnel médical et une insuffisance de l'hygiène des mains.

2.2.3. Epidémiologie de la résistance

L'harmonisation des critères de résistance des souches bactériennes au niveau européen a été élaborée en 1996 par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), afin de classer les souches dans les catégories sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R). L'uniformisation de ces valeurs est indispensable pour comparer la prévalence de la résistance entre les différents pays de l'union européenne. Les données présentées dans le tableau 7 fournissent une vue d'ensemble de la sensibilité de *P. aeruginosa* en France à travers plusieurs enquêtes réalisées par différents réseaux et dans le monde (Tableau 8).

Tableau 7. Pourcentages de souches de *P. aeruginosa* sensibles en France d'après plusieurs enquêtes.

Réseaux	année	% de souches sensibles				
		TIC	CAZ	IMP	CIP	AN
REUSSIR *	2006	60,6	85,5	83,8	69,6	83,0
Ile de France **	2006	66,7	85,0	92,8	75,4	92,8
	2005	77,7	90,4	81,9	77,7	94,7
C-CLIN **	2006	NC	80,5	74,5	64,9	79,7
ONERBA	2007	79,5	81,4	81,6	73,7	68,9
GERPB *	2004	76	83	86	68	62

TIC, ticarcilline ; CAZ, ceftazidime ; IMP, imipénème ; CIP, ciprofloxacine ; AN, amikacine
 * toutes les souches ; ** les souches responsables de bactériémies

Tableau 8. Proportion de souches de *P. aeruginosa* sensibles sur les différents continents d'après plusieurs enquêtes (111).

Continent	% de souches sensibles										
	TIC	TCC	FEP	CAZ	ATM	TZP	IMP	CIP	TM	GM	AN
Europe	74	78	80	80	73	86	82	72	76	72	86
Amérique latine	58	59	66	65	49	76	76	63	65	62	73
Amérique du nord	78	78	82	80	66	90	87	79	92	84	95
Asie pacifique	76	75	83	79	67	89	88	85	90	84	95

TIC, ticarcilline ; TCC, ticarcilline+acide clavulanique ; FEP, céfépime ; CAZ, ceftazidime ; ATM, aztréonam ; TZP, pipéracilline+tazobactam ; IMP, imipénème ; CIP, ciprofloxacine ; TM, tobramycine, GM, gentamicine ; AN, amikacine

Les épidémies hospitalières liées à *P. aeruginosa* multi-résistant sont de plus en plus souvent rapportées (43-46), la prévalence de la multi-résistance parmi les souches de *P. aeruginosa* est relativement faible en dehors des patients atteints de mucoviscidose, mais varie largement avec le lieu. En effet, selon les données du rapport établi en 2008 par l'EARSS (112), les souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* (souches résistantes à au moins trois classes majeures d'antibiotiques) représentaient 17 % des 8252 isolats provenant de 32 pays en 2008.

Le phénotype majeur (6 % des isolats) correspondait à une résistance à cinq classes d'antibiotiques (pipéracilline, ceftazidime, fluoroquinolones, aminoglycosides et carbapénèmes). Selon les auteurs, il existe un gradient géographique de la résistance, commun à celui retrouvé chez les autres bactéries à Gram négatif : faible dans le Nord et plus élevé dans le Sud de l'Europe.

En France, les critères établis pour les antibiotiques sont ceux du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (113). Dans l'Inter-Région Est, les résultats de la surveillance (rapport 2009) indiquaient une stabilité du taux d'incidence (/1000 jours d'hospitalisation) des prélèvements à visée diagnostique positifs à *P. aeruginosa* toto-résistant sur la période 2007-2009 (0,018 en 2007, 0,007 en 2008 et 0,011 en 2009) (114). La comparaison avec des données antérieures suggère une certaine stabilisation dans l'évolution de la résistance du bacille pyocyanique en France (115, 116).

2.3. Emergence et diffusion de la multi-résistance

La progression de la résistance aux aminosides, ainsi qu'aux autres molécules anti-pyocyaniques, pose actuellement des problèmes dans la prise en charge. Malgré une prise en charge précoce des infections liées à *P. aeruginosa* par une antibiothérapie adaptée et l'utilisation de doses importantes d'antibiotiques, l'effet bactéricide sur le bacille pyocyanique est de plus en plus difficile à atteindre (117). La résistance qui en résulte, permet à la bactérie de s'adapter temporairement à son environnement (6).

L'acquisition d'une infection liée à une souche multi-résistante de *P. aeruginosa* chez un patient hospitalisé dépend à la fois de l'effet de la pression de sélection des antibiotiques, et de la transmission croisée (118-120).

2.3.1. Acquisition de la multi-résistance

La prescription thérapeutique joue un rôle essentiel dans l'émergence et la diffusion de la multi-résistance. L'utilisation inappropriée d'antibiotique anti-pyocyanique chez un patient peut conduire à l'émergence d'une résistance bactérienne se traduisant par une mauvaise réponse clinique, voire un échec thérapeutique (121, 122).

Le risque relatif d'un tel événement devrait être pris en compte dans le choix et la conduite d'une bonne antibiothérapie. Cela semble d'autant plus important, que des résistances surgissent en cours de traitement chez au moins 10% des patients infectés ou colonisés par *P. aeruginosa* (10, 123).

Toutefois, la plupart des études rapportées dans la littérature ne font pas la distinction, pourtant essentielle, entre l'acquisition de caractères de résistance par une souche présente initialement chez un malade et l'implantation chez ce même malade d'une autre souche de *P. aeruginosa* plus résistante que la première et qui, éventuellement, supplantera celle-ci. Cette distinction nécessite l'analyse génotypique des isolats de *P. aeruginosa* de chaque patient au cours du temps qui seule peut permettre de faire la part entre ces deux phénomènes très différents, nécessitant des mesures de prévention spécifiques. En effet, la maîtrise de la dissémination des souches multi-résistantes passe essentiellement par des mesures d'hygiène (détection des porteurs, mesures d'isolement, décontamination des réservoirs environnementaux éventuels) (124), tandis que la prévention de l'émergence de mutants résistants passe par une optimisation de l'antibiothérapie individuelle (nature et posologie des antibiotiques utilisés) (10).

En l'absence de données génotypiques précises sur les isolats de *P. aeruginosa*, il paraît assez difficile d'évaluer l'impact réel d'un antibiotique ou d'un schéma thérapeutique particulier sur la genèse de mutants résistants dans une unité de soins. Diverses études arrivent cependant à la conclusion que l'exposition à certains antibiotiques, notamment l'imipénème (125, 126) ou les fluoroquinolones (108, 127, 128), constitue un facteur de risque significatif pour l'émergence ou l'acquisition de souches résistantes.

Cette observation s'accorde avec le fait que le développement de la résistance aux fluoroquinolones ou aux carbapénèmes dépend de mutations spontanées relativement peu spécialisées ayant toutes les chances de se produire lorsque les inoculums infectieux sont importants, notamment au niveau pulmonaire (inoculums parfois supérieurs à 10^{10} bactéries) (129). Toutefois, les exemples pourraient être multipliés avec d'autres antibiotiques anti-pyocyanique puisque l'administration de pipéracilline-tazobactam (130) ou de ceftazidime (131) apparaît, elle aussi, comme un facteur de risque pour le portage ou l'émergence de souches résistantes à ces β -lactamines.

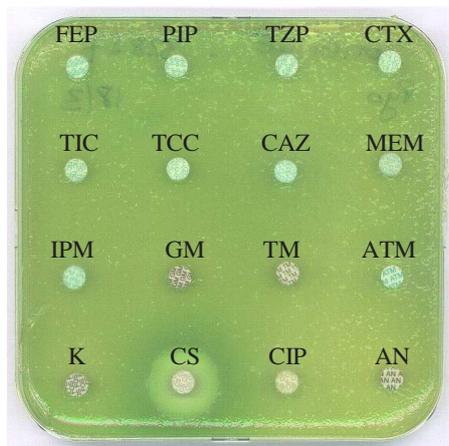
Ainsi, à l'échelle d'un service ou d'un hôpital, la prescription accrue d'un antibiotique antipyocyanique se traduit fréquemment par une augmentation des isolats résistants de *P. aeruginosa* (132).

2.3.2. Prévention de l'émergence de la multi-résistance

Même s'il n'existe pas de moyens pour éviter l'acquisition par une souche donnée de *P. aeruginosa* de matériel génétique étranger portant des gènes de résistance, il est possible d'optimiser l'antibiothérapie afin de minimiser l'émergence de mutants résistants. Car le fait de recevoir un antibiotique augmente le risque d'être secondairement colonisé et/ou infecté par des bactéries résistantes. Pour cela, le choix des antibiotiques anti-pyocyaniques revêt une grande importance puisqu'il conditionne la nature même des mutants susceptibles de se développer. Certains antibiotiques, comme l'imipénème (ou la fosfomycine) sélectionnent des résistances très spécifiques et n'affectant qu'eux mêmes. Par contre, les autres β -lactamines (y compris le méropénème), les fluoroquinolones et plus rarement les aminosides peuvent favoriser le développement d'une résistance à plusieurs antibiotiques apparentés et créer une co-résistance, ou à des produits appartenant à des familles différentes et donnant lieu à une résistance croisée. Par exemple, les fluoroquinolones présentent une aptitude particulière à sélectionner *in vivo* des mutants multirésistants par efflux actif (52, 133), et la surproduction de systèmes d'efflux actif ou d'enzymes inactivatrices, ce qui est à l'origine d'une résistance aussi bien aux β -lactamines qu'aux aminosides (134, 135). Ainsi, l'emploi simultané de deux antibiotiques pourrait donc, en théorie, réduire le risque d'émergence de bactéries mutantes grâce à une synergie d'action, sous réserve que les produits en question ne soient pas affectés par le même mécanisme de résistance, comme l'efflux actif.

A l'hôpital, des stratégies sont proposées pour prévenir la transmission croisée de patient à patient des bactéries multirésistantes (BMR). Ces stratégies reposent sur le dépistage du portage de BMR chez les patients à risque lors de l'admission à l'hôpital et/ou en cours d'hospitalisation suivi des précautions standard et précautions complémentaires lors de la réalisation de soins à risque ou encore de la signalisation des patients porteurs de BMR, qu'ils soient colonisés ou infectés. Si ces mesures n'ont pas toutes été validées individuellement, leur application simultanée a permis, non seulement de maîtriser des situations épidémiques locales mais aussi de réduire plus globalement l'endémicité en France (136).

En réalité, les données brutes sur la prévalence de la résistance peuvent donner abusivement l'impression au clinicien qu'il existera toujours des alternatives thérapeutiques. Cet optimisme doit être tempéré, surtout dans une période où les innovations en matière d'antibiotiques se font rares, car plusieurs études plutôt alarmantes font état en Europe de pourcentages non négligeables (de 5 à 59 %) de souches de *P. aeruginosa* résistantes à au moins cinq antibiotiques antipyocyaniques majeurs et d'isolats (2 à 24 %) insensibles à tous les produits testés (121, 137) (Figure 4).



Liste des antibiotiques testés :

FEP : céfépime, PIP : pipéracilline,
 TZP : pipéracilline+tazobactam,
 CTX : céfotaxime, TIC : ticarcilline,
 TCC : ticarcilline+acide clavulanique,
 CAZ : ceftazidime, MEM : méropénème,
 IMP : imipénème, GM : gentamicine,
 TM : tobramycine, ATM : aztréonam,
 K : kanamycine, CS : colistine,
 CIP : ciprofloxacine, AN : amikacine

Figure 4 : Antibiogramme d'un isolat clinique « toto-résistant » par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton.

Ainsi, on observe une circulation de plus en plus importante dans nos hôpitaux de souches multi-résistantes, clonales ou non, contre lesquelles les options thérapeutiques s'avèrent très limitées. On conçoit aisément que des souches présentes de façon endémique dans un service finissent avec le temps par cumuler une multitude de résistances différentes (138, 139). De telles souches peuvent, en revanche, retrouver une certaine sensibilité lorsqu'elles gagnent des unités ou des établissements où la pression antibiotique est moins forte (140).

L'émergence de souches dites 'toto-résistantes' (toto-R) dans certains services cliniques, c'est à dire résistantes à toutes les molécules anti-pyocyanique traditionnelles utilisées, a récemment compliqué la prise en charge des patients infectés par *P. aeruginosa* et entraîné une surmortalité inquiétante (141). Toutefois, les informations sur ce phénomène émergent restent partielles et contradictoires, notamment en ce qui concerne les mécanismes permettant à certaines souches de devenir résistantes à tous les antibiotiques et la capacité de certains clones à devenir épidémiques (142, 143).

2.4. La mucoviscidose

P. aeruginosa est particulièrement redouté dans la mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas. Cette pathologie est une maladie génétique (taux d'incidence estimé à 1 sur 4600 naissances) due à des anomalies de la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) qui est une protéine intervenant principalement dans les échanges ioniques au niveau des cellules glandulaires (144, 145). La production d'un mucus visqueux qui en résulte favorise la colonisation bronchique par diverses espèces bactériennes dont la plus significative sur le plan de la pathogénicité est *Pseudomonas aeruginosa* (7, 146). La primo-colonisation doit être dépistée très précocement et traitée afin d'éviter l'implantation définitive de la bactérie.

La présence de *P. aeruginosa* s'accompagne souvent d'une dégradation progressive de la fonction respiratoire, rythmée par des phases d'exacerbation infectieuse. Le traitement de ce type d'infection-colonisation repose généralement sur l'utilisation d'antibiotiques tels que les β -lactamines et les aminosides (147). Si l'éradication de la bactérie peut être obtenue aux premiers stades de la colonisation grâce à l'administration d'antibiotiques adaptés, elle devient pratiquement impossible lorsque l'infection a atteint un stade chronique. En effet, malgré l'administration massive et répétée d'antibiotiques par voie parentérale et sous forme d'aérosols, *P. aeruginosa* subsiste dans les voies aériennes. Cette mauvaise efficacité thérapeutique résulte en partie des nombreux mécanismes de résistance, stables ou instables, développés par la bactérie chez les patients atteints de mucoviscidose (148, 149).

2.5. Thérapeutique

Aujourd'hui, la stratégie d'antibiothérapie doit être définie de façon très spécifique que ce soit sur le plan qualitatif (choix des antibiotiques), ou sur le plan quantitatif (doses et rythmes de consommation). L'antibiothérapie de première intention repose sur les antibiotiques les plus actifs, et administrés le plus souvent en association pour éviter à tout prix l'émergence de résistance, mais aussi pour obtenir un meilleur effet bactéricide (150).

Toutefois, il est important d'adapter l'antibiothérapie en fonction des résultats de l'antibiogramme, même si l'évolution clinique semble favorable, afin d'éviter d'éventuelles rechutes dues à des mutants résistants. Mais, l'émergence de souches de *P. aeruginosa* toto-résistantes, oblige les cliniciens à envisager des antibiothérapies de secours, longtemps délaissées comme la colistine intraveineuse (151).

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes utilisées

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* incluses dans cette étude proviennent du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon et d'une étude multicentrique incluant les hôpitaux universitaires régionaux de l'inter-région Est (Figure 5). L'ensemble des souches a été isolé à partir de prélèvements cliniques ou de prélèvements d'environnement positifs à *P. aeruginosa*, hors patients atteints de mucoviscidose. Ces prélèvements étaient soit à visée diagnostique, soit à visée épidémiologique (dépistage). Le recueil des souches a été effectué entre le 1^{er} octobre 2007 et le 31 mai 2010, soit sur une durée de 32 mois.

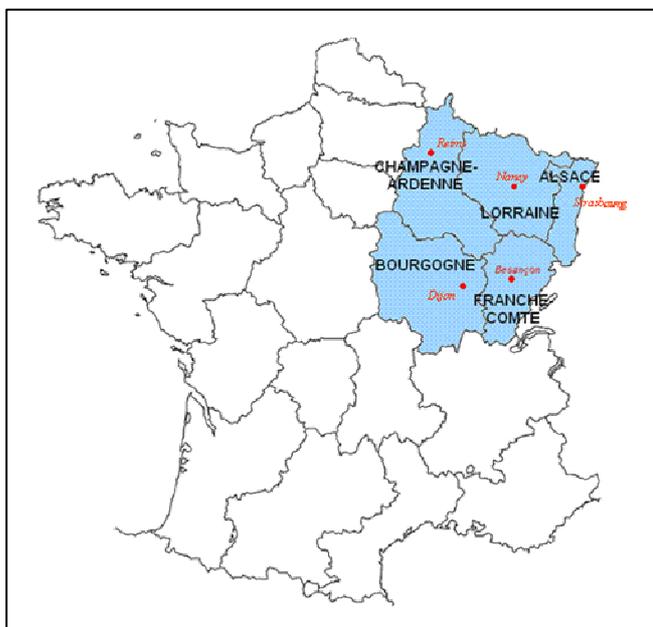


Figure 5 : Carte géographique de l'inter-région Est (8,5 millions d'habitants soit environ 14 % de la population française).

2. Identification des souches

L'identification des souches a été réalisée selon les méthodes conventionnelles (152). La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) et les critères de lecture et d'interprétation ont été ceux du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (113).

La recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) était effectuée par un test de synergie combinant la ceftazidime ou le céfépime avec l'acide clavulanique (Diagnostics Pasteur), sur milieu MH seul et additionné de cloxacilline à 250 mg/L (153, 154).

3. Techniques de biologie moléculaire

L'épidémiologie des infections associées aux soins, et notamment celles impliquant les bactéries multi-résistantes a considérablement bénéficié de l'apport de la biologie moléculaire (155) pour le typage des micro-organismes en cause. En effet, si l'antibiotypie (marqueur phénotypique, comparaison des profils de résistance aux antibiotiques) garde un intérêt, les méthodes (marqueurs) génotypiques permettent de dépasser les limites de cette technique (pouvoir discriminant faible, modification possible des profils de résistance aux antibiotiques au cours du temps, au gré de l'évolution de la pression de sélection).

3.1. Isoélectrofocalisation (IEF) des β -lactamases

3.1.1. Principe

Il s'agit d'une méthode de séparation des protéines d'un mélange basée sur la différence du point isoélectrique (pI) qui varie de 1 à 12. L'électrophorèse est pratiquée sur un support dans lequel un gradient de pH est préétabli. Les protéines (enzymes) déposées migrent vers l'anode ou vers la cathode selon leur charge, mais au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge. Quand la charge nette est nulle, la protéine ne se déplace plus et focalise à l'endroit où le $\text{pH} = \text{pI}$. Le gradient de pH est créé en utilisant des ampholines, qui sont des ampholytes supports : ce sont des mélanges de molécules de faibles masses molaires, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine. Par conséquent le pôle anodique attire les ampholytes acides, ayant un pI bas, le pôle cathodique attire les ampholytes alcalins, ayant un pI haut. Il se crée ainsi un gradient de pH qui augmente de l'anode à la cathode. La révélation s'effectue par la nitrocéphine, céphalosporine chromogène dont l'hydrolyse par les β -lactamases s'accompagne d'une coloration orangée. La détermination du pI de la β -lactamase exprimée par la souche à identifier va permettre de se focaliser sur une famille enzymatique.

3.1.2. Mode opératoire

Le temps nécessaire à la réalisation de la manipulation est estimé à environ 3 heures.

Préparation des réactifs:

Sur un gel d'ampholine (Amersham Biosciences 80-1124-80) ont été déposés des petits buvards (Sample application pieces, GE Healthcare 80-1129-46), imbibés de 5 μ l de solution standard Bio-Rad (Bio-Rad 161-0310) plus 15 μ L de chaque lysat bactérien étudié sur chacun des buvards.

Ensuite, deux bandelettes ont été imbibées d'électrolytes, la solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 1 M a été déposée vers l'anode et la solution de soude (NaOH) à 1 M vers la cathode. L'amplificateur LKB de l'appareil à isoélectrofocalisation a été réglé à 1500 V, 50 mA, 30 W, et le circuit d'eau réfrigérée à 11°C.

Lecture du gel :

Après 1h 30min de migration, un tube de nitrocéphine à 1 mM a été versé sur le gel et les emplacements marquant l'hydrolyse des β -lactamines ont été révélés sur le quadrillage posé sous le gel.

Résultat et interprétation :

La droite de migration en fonction du pHi ($y = f(\text{pHi})$) a été tracée grâce aux souches témoins (Tableau 9). Le pHi des souches a été déterminé en fonction de la distance de migration et donnait ainsi une indication sur la famille de β -lactamases recherchée.

Tableau 9 : Tableau de référence avec les points isoélectriques des souches témoins de *P. aeruginosa*.

Témoins de référence	pI
TEM-1	5,4
PER-1	5,3
OXA-18	5,5
TEM-24	6,5
TEM-2	5,6
AmpC	8,2

3.2. Identification des β -lactamases par PCR (polymerase chain reaction)

3.2.1. Principe

Mise au point par Kary Mullis en 1983 (156, 157), la Polymerase Chain Reaction (PCR) consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible (Figure 6). Les réactions d'amplification des gènes codant pour les β -lactamases sont réalisées avec un couple d'amorces spécifiques (Eurogentec) dans un thermocycler de type Biométra T3 (Biolabo Scientific Instruments) en présence de *Taq* DNA Polymerase (Roche®) en respectant les conditions d'utilisations spécifiées par le fournisseur. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (www.ncbi.nlm.nih.gov).

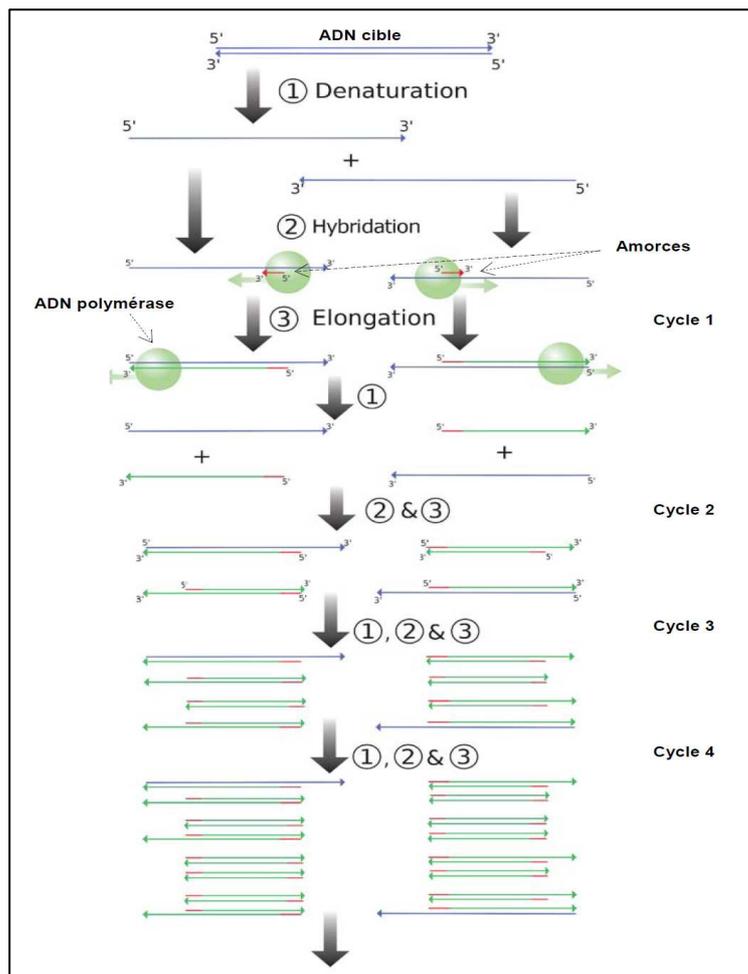


Figure 6 : Amplification d'une séquence par PCR.

3.2.2. Mode opératoire

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Qiagen : 51304 Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

Amplification d'ADN par PCR

Le mélange réactionnel se compose de 0,2 μ M de dNTP, de 2 mM de $MgCl_2$, de tampon Taq Biofidal 1X, de 2,5 U de *Taq* Biofidal (Biofidal, Vaulx en Velin, France), de 0,5 μ M de chaque amorce et de 2 μ l d'ADN (Tableau 10).

Tableau 10 : Tableau réactionnel de préparation des Mix pour la l'identification β -lactamases par PCR.

Mix PCR pour 1 réaction	Volume (en μ l)	Concentration finale
dNTP 10 μ M	0,5	0,2 mM
Tampon Taq Biofidal 10x	5	1 X
$MgCl_2$ 25 mM	5	2 mM
Amorce 1 (10 μ M)	3	0,5 μ M
Amorce 2 (10 μ M)	3	0,5 μ M
Taq Biofidal	0,5	2,5 U
Eau	28	-
Extrait ADN	2	-

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur T3 (Biometra, Biolabo Scientific Instruments, Lausanne, Suisse) selon les conditions suivantes : 5 min à 94°C puis 35 cycles (94°C – 30 s, T°C – 30 s, 72°C – 30 à 45 s) et une élongation finale de 7 min à 72°C (Tableau 11).

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des programmes PCR pour les différentes β -lactamases.

PCR	TEM	SHV	PSE	OXA groupe I	OXA groupe III	VEB	GES	BEL	VIM	PER	IMP	PSE
Température et temps hybridation	45 sec à 58°C	45 sec à 58°C	45 sec à 58°C	45 sec à 50°C	30 sec à 54°C	30 sec à 58 °C	45 sec à 58°C	30 sec à 58°C	30 sec à 58°C	45 sec à 55°C	30 sec à 55°C	45 sec à 57°C
Temps élévation	30 sec	30 sec	30 sec	45 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	45 sec	30 sec	45 sec

Electrophorèse analytique de l'ADN

La migration de l'ADN obtenu après extraction, restriction ou amplification s'effectue dans un gel horizontal d'agarose 1 % (p/v) pendant 1 h sous une tension de 100 V. Le tampon de migration utilisé est le TAE 1X (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La révélation s'effectue par transillumination avec une lumière UV ($\lambda=320$ nm) après immersion du gel dans une solution de BET (0,5 μ g/ml) durant 30 min. Le traitement d'image est réalisé grâce au système Chemidoc XRS (Bio-Rad).

Purification des produits de PCR

Les produits PCR sont purifiés grâce au Kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Allemagne).

Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN extrait est évaluée par spectrophotométrie dans l'UV à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 μ g/mL d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est confirmée par un rapport des absorbances à 260 et 280 nm compris entre 1,8 et 2.

Séquençage de l'ADN

Le séquençage d'ADN a été réalisé par la plateforme technique « séquençage, analyse de fragments » de l'IFR 133 (UFR SMP, Besançon), à l'aide de l'appareil 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les réactions de séquençage ont été effectuées par la méthode des didéoxynucléotides de Sanger (158) à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) à partir de 4 ng de produit PCR précédemment purifié. Les résultats obtenus ont été analysés grâce au logiciel SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems).

3.3. Electrophorèse en champ pulsé

3.3.1. Principe

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis) a été mise au point dans les années 1980 (159). Cette technique, tout comme l'électrophorèse continue, nécessite l'utilisation d'ADN purifié. La préparation de l'ADN bactérien se fait par lyse *in situ* des cellules d'une colonie dans une matrice semisolide d'agarose ("plug"), pour éviter les forces de cisaillement susceptibles d'endommager l'ADN. L'ADN ainsi purifié est soumis à l'action d'une enzyme de restriction qui est une endonucléase, afin de donner une série de fragments dont la taille et le nombre est caractéristique de l'ADN étudié. Les fragments séparés sont révélés par coloration au BET dans le but de donner l'empreinte génétique caractéristique de chaque isolat (Figure 6).

L'ECP est une technique discriminante qui permet de distinguer des souches génétiquement très proches et offre une bonne reproductibilité, malgré un délai d'analyse relativement long. Cette méthode a prouvé son efficacité dans de nombreuses enquêtes épidémiologiques et a permis la comparaison de nombreux génotypes dont l'identification aurait été difficile par d'autres méthodes (160-162).

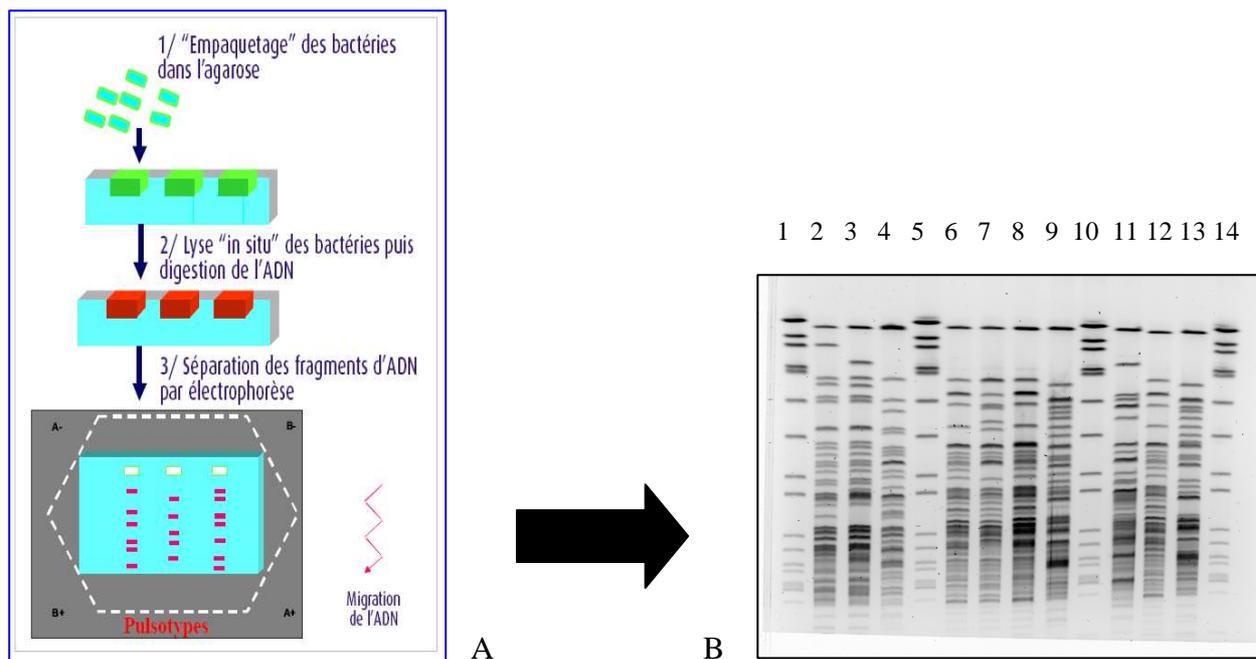


Figure 7 : L'électrophorèse en champ pulsé, mode opératoire (A) et photo d'un gel (B).

- Pistes 1, 5, 10 et 14: standard de référence *S. aureus* NCTC 8325
- Pistes 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 13: souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes

3.3.2. Mode opératoire

La technique de génotypage par l'électrophorèse en champ pulsé se déroule sur une durée de neuf jours. Elle est réalisée selon la méthode développée au sein du laboratoire du service d'hygiène hospitalière du CHU de Besançon (163).

J1 : Préparation de l'ADN total

Les différentes souches de *P. aeruginosa* ont été cultivées sur un milieu gélosé MH pendant 18 heures à 37°C.

J2 : Préparation des blocs (insertion de l'ADN dans une matrice d'agarose)

Une quantité de bactéries a été mise en suspension dans 1 ml de tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,6 (PETT IV) à raison de 10^9 UFC/ml. Les cellules étaient récupérées par centrifugation à 10 000 g puis remises en suspension dans 1 ml de tampon PETT IV à 42°C.

Cette suspension était mélangée avec un volume égal d'agarose à bas point de fusion (Incert agarose ; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA), à 1 % dans le tampon PETT IV, puis après liquéfaction la solution obtenue était coulée dans des moules Bio-Rad. Les blocs étaient solidifiés dans de la glace puis incubés dans un mélange EDTA 0,5 M, N-lauroylsarcosine à 1 %, protéinase K à 1 mg/ml, pH 8,0 (ESP) pendant 48h à 55°C pour permettre la lyse de la paroi et la déprotéinisation.

J5 : Lavage des blocs

Après la protéolyse, les incerts d'ADN génomique étaient incubés 2 fois à 42°C pendant une heure avec un tampon Tris-acide acétique 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 (TE-acétate) contenant du fluorure de phénylméthanesulphonyle 1 mM (PMSF) pour inactiver la protéinase K, puis 2 fois une heure à 42°C avec le tampon TE-acétate pour éliminer le PMSF. Un tiers de ces incerts a été finalement incubé à 4°C une nuit, avec le tampon de l'endonucléase approprié, pour éliminer l'EDTA. Les deux autres tiers de chaque bloc d'agarose étaient conservés en tampon TE-acétate à 4°C pour une éventuelle utilisation ultérieure. Parallèlement, pour permettre la comparaison des profils intra-gels et inter-gels, la souche de référence de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Culture) a été préparée et placée dans du tampon adapté à l'enzyme de restriction *SmaI* et placée également à 4°C.

J6 : Restriction enzymatique

Les incerts (1/3) d'ADN génomique ont été incubés avec 40 unités de l'endonucléase appropriée, à la température optimale d'activité de l'enzyme :

DraI (Roche Diagnostics) pour *P. aeruginosa* : 37°C

SmaI (Q-BIOgene) pour *Staphylococcus aureus* : 25°C.

J7 : Séparation des fragments d'ADN

Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DRIII, Bio-Rad, Richmond, USA) sous les conditions suivantes : 5,5 V/cm à 14°C, avec des impulsions de 20 secondes pendant 12 heures puis de 5 à 15 secondes pendant 17 heures. La souche de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 a été incluse dans chaque gel après restriction par *SmaI*.

J8 : Révélation du gel

Les gels d'électrophorèse ont été colorés par une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml durant 30 min, puis lavés à l'eau distillée pendant 2 heures, avant d'être révélés par transillumination aux rayons ultraviolets à 312 nm et photographiés avec le système Visio-Capt (Labgene).

J9 : Comparaison des profils électrophorétiques et interprétation

Le logiciel GelCompar version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) a été utilisé pour établir la matrice de similitude d'ADN basée sur le calcul du coefficient de corrélation de Dice, et construire le dendrogramme en utilisant l'algorithme de hiérarchisation UPGMA (unweighted pair group method using mathematical averages). La souche de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 incluse tous les 3 ou 4 puits permet la normalisation des gels et assure la comparabilité des profils intra-gels et inter-gels.

Les génotypes majeurs ont été définis comme les profils obtenus par ECP différant les uns des autres par plus de 5 fragments, selon les recommandations de Tenover et al. (164, 165).

Les souches dont le profil différait jusqu'à 5 fragments, ont été considérées comme des variants à l'intérieur des génotypes majeurs. Quand il n'y avait aucune différence entre les profils, les souches étaient considérées comme identiques. Les génotypes majeurs ont été dénommés par un chiffre (Tableau 10).

Tableau 12. Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générés par PFGE (d'après Tenover *et al.*(165))

Catégorie	Nombre d'évènements génétiques	Nombre de fragments différents	Interprétation épidémiologique
Identiques	0	0	Les isolats font partie de l'épidémie
Étroitement liés	1	2-3	Les isolats font probablement partie de l'épidémie
Probablement liés	2	4-6	Les isolats sont peut-être liés à l'épidémie
Différents	≥ 3	≥ 7	Les isolats ne font pas partie de l'épidémie

Les clones contenant les souches cliniques ont été définis comme :

- sporadiques : isolé chez un seul patient
- micro-épidémiques : isolé chez deux à trois patients
- épidémiques : isolé chez plus de trois patients

3.4. Multi-locus sequence typing

3.4.1. Principe

La technique de Multi Locus Sequence Typing (MLST) permet l'étude de l'évolution phylogénétique de nombreuses espèces bactériennes comme *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Staphylococcus aureus* (166-168). C'est une nouvelle approche moléculaire dérivée de l'électrophorèse des isoenzymes.

Le MLST est basé sur le séquençage de 5 à 10 gènes de ménage « house keeping genes », importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques de chaque espèce.

Pour *P. aeruginosa*, la technique de MLST a été développée et mise au point par Curran et *al.* en 2004 (169), puis modifié par van Mansfeld R et *al.* en 2009 (170), ce travail tient lieu de référence dans l'étude de cette bactérie. Elle est basée sur l'analyse par séquençage nucléotidique du polymorphisme de 7 gènes domestiques (Tableau 11) répartis sur le chromosome bactérien et conservés au cours de l'évolution.

L'alignement des séquences d'un locus donné permet de repérer les allèles différents entre eux par des mutations et/ou recombinaisons. Pour chaque souche bactérienne, la combinaison des allèles obtenus à partir de chaque locus sélectionné permet de définir une séquence type (ST) représentant un génotype multilocus. Ces séquences types avec les allèles qu'elles définissent sont consultables dans les bases de données centralisées accessibles en libre accès sur Internet (<http://pubmlst.org>). Les liens entre les différentes souches d'une même bactérie peuvent alors être représentés sous forme d'arbres phylogénétiques. Le MLST permet également de mettre en évidence les liens phylogénétiques entre les clones.

Tableau 13 : Caractéristiques des 7 loci utilisés en Multi Locus Sequence Typing

Locus	Fonction du gène	Position (pb)	Taille (pb)	Nombre d'allèles
<i>acsA</i>	Acetyl coenzyme A synthetase (PA0887)	969670	390	145
<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase (PA0025)	27535	498	146
<i>guaA</i>	GMP synthase (PA3769)	4227237	373	115
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein (PA4946)	5551681	442	124
<i>nuoD</i>	NADH dehydrogenase I chain C, D (PA2639)	2983963	366	86
<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthase (PA770)	1914037	370	95
<i>trpE</i>	Anthralite synthetase component I (PA0609)	670980	443	128

3.4.2. Mode opératoire

Extraction de l'ADN par la méthode dite de l'ébullition (« boiling »)

Quelques colonies ont été mises en suspension dans 400 µl d'eau déminéralisée stérile. La suspension obtenue est incubée à 37°C pendant 30 min avant d'être chauffés au bain-marie à 95°C pendant 10 min. Puis refroidie dans la glace pendant 10 minutes. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 20 min, 50 µl de surnageant a été ensuite récupéré. Le surnageant (2,5 µl) est utilisé comme ADN pour les techniques d'amplification.

Amplification des 7 gènes

Les amorces ont été construites à l'aide du logiciel Primer 3 Input 0.4.0 (www.frodo.wi.mit.edu). Les réactions d'amplifications réalisées avec ces amorces ont permis d'obtenir des amplicons de taille et de séquence attendue (Tableau 12).

Tableau 14 : Amorces de séquençage de référence pour le typage par MLST de *P. aeruginosa*.

Locus	Séquences d'amorce (5' → 3')		Taille amplicon (pb)
	Forward	Reverse	
<i>acsA</i>	AAGGCGTGGCTGCATACCA	CGGCCAGGAGTCGAGGATC	390
<i>aroE</i>	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	GCGCCAGAGGAAGAATGCC	495
<i>guaA</i>	ACTAGGCGTGCAATTCCAC	GAACGGGTGGCGGTAGACC	372
<i>mutL</i>	AGCCTGGCAGGTGGAAACC	CTCTCCAGCACGCTCTCGG	441
<i>nuoD</i>	GGGACATGTACGGCATCACCT	GCGCAGGATGCTGTTCTTCA	366
<i>ppsA</i>	CGGTCAAGGTAGTGGACGTCG	TTCTTGCGCACATCGAAACC	369
<i>trpE</i>	CGCGAGGACTATGAAAACGC	CGCTTGTTGATGGTTTCTT	441

Le mélange réactionnel (50 µl) utilisé lors de la réaction de PCR était composé de 5 µl de tampon PCR 1X (Roche®), 2 µl de dNTPs à 200 µM, 3 µl de MgCl₂ à 1,5 mM, 2 µl d'amorce spécifique de chaque gène à 20 µM, 0,25 µl de Taq polymérase et 2,5 µl de Mix d'ADN extrait. Les conditions d'amplifications ont été les suivantes : 1 cycle de dénaturation de l'ADN bicaténaire pendant 10 min à 96°C puis une seconde étape composée de 25 cycles d'amplification enchaînant une phase de dénaturation de 30 s à 95°C, une phase d'hybridation de 30 s à 55°C et une phase d'élongation 1 min à 72°C, et enfin un cycle final d'élongation de 7 min à 72°C (Figure 7).

Contrôle des produits amplifiés

Les produits d'amplification (10 µl) ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1.5 % (p/v) dans une solution de TAE 1X (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), pendant 1H 30min sous une tension de 100 V. La taille des produits amplifiés a été visualisée par transillumination UV ($\lambda=320$ nm) après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium à 0,1 µg/mL (Biorad®) durant 30 min.

Le marqueur de taille moléculaire DNA Ladder 100 bp (Biolabs®) a été placé à l'extrémité du gel afin de pouvoir analyser la taille des fragments retrouvés. Le traitement d'image a été réalisé grâce au système Chemidoc XRS (Bio-Rad).

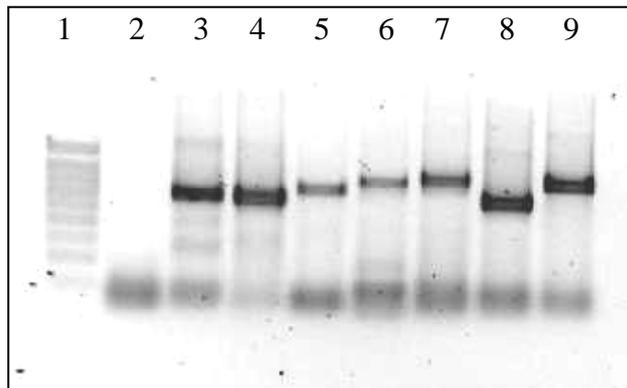


Figure 8 : Photographie d'un gel de contrôle des produits de PCR.

Piste 1 : marqueur de poids moléculaire, 2 : témoin, 3 : allèle *acsA*,
4 : *aroE*, 5 : *guaA*, 6 : *mutL*, 7 : *nuoD*, 8 : *ppsA*, 9 : *trpE*.

Purification des produits amplifiés par précipitation à l'éthanol

Les 40 µl restant du produit de réaction ont été mélangé avec 4 µl d'acétate de sodium 3 M, pH = 5,2 et avec 100 µl d'éthanol 95% froid. L'ensemble a été placé à -80°C pendant 1heure. Puis après une première centrifugation à 14 000 rpm, 4°C, pendant 30 min, le surnageant a été éliminé et 200 µl d'éthanol à 70 % a été ajouté. Suit une seconde centrifugation à 14 000 rpm, 4°C, pendant 15 min après laquelle le surnageant a été à nouveau éliminé et le culot est séché. Le culot a été repris ensuite avec 50 µl d'eau distillée stérile.

Dosage de l'ADN amplifié et séquençage de l'ADN

Même méthode décrite dans la partie PCR page 51

Analyse des séquences obtenues

Le séquençage a permis d'obtenir des séquences sens et anti-sens pour chacun des 7 gènes qui ont été comparées avec les séquences de références renseignées par la base de données (<http://pubmlst.org>).

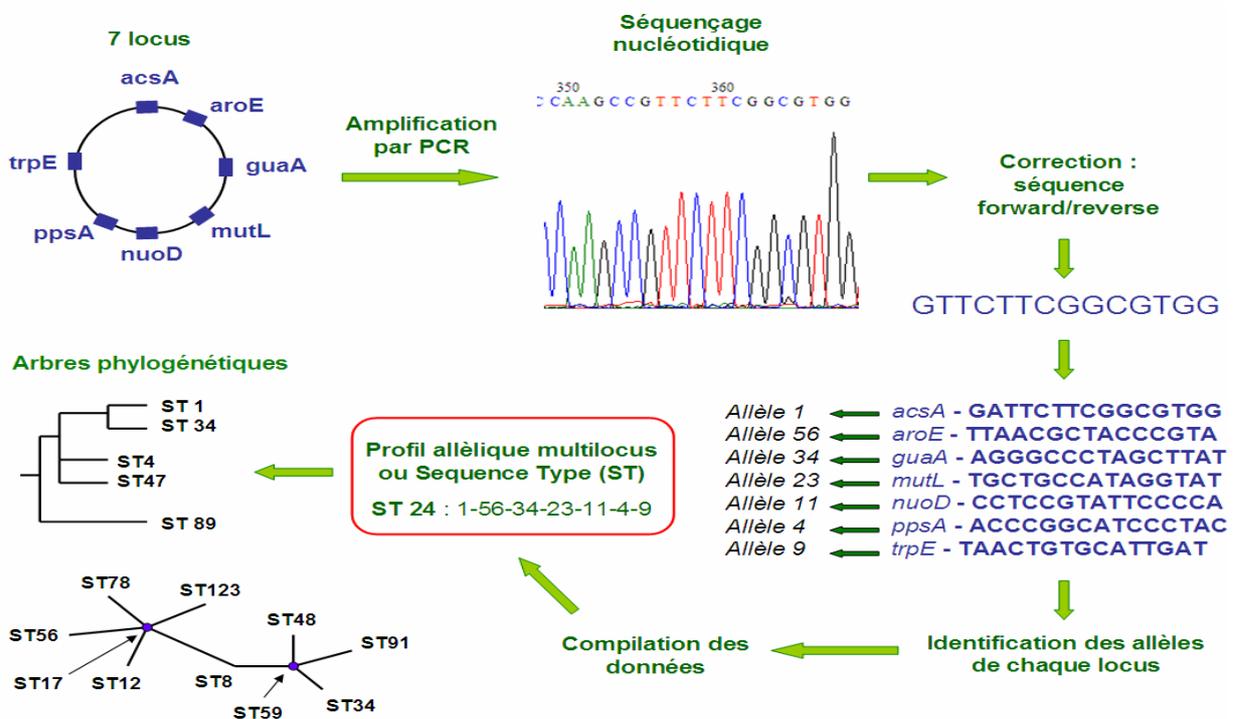
A chaque séquence un numéro d'allèle a été attribué. Grâce à la combinaison des 7 numéros d'allèles, une séquence type (ST) a été déterminée pour chaque souche bactérienne. Les STs ont été comparées entre elles grâce au logiciel eburst (version 3) en libre accès sur <http://eburst.mlst.net> (171, 172).

L'algorithme BURST (Based Upon Related Sequence Type) compile les données MLST et identifie les « single locus variants » (SLVs) entre toutes les séquences types (STs). Le ST fondateur est défini comme celui ayant le plus grand nombre de SLVs avec d'autres STs et non pas celui le plus fréquent dans la population. A partir du ST fondateur se greffent les STs variant par un seul locus (SLV) à partir desquels peuvent être raccrochés les STs variant par deux locus (DLV). Dans le cas de STs non liées, on ne peut pas avoir d'informations sur leur distance génétique.

Dendrogramme

Une classification hiérarchique des souches étudiées a été établie avec la construction d'un dendrogramme. Le dendrogramme est construit d'après l'algorithme de hiérarchisation UPGMA en utilisant le logiciel en accès libre sur : <http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse>.

Figure 9 : Schéma récapitulatif de la technique de Multi Locus Sequence Typing.



3. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EpiInfo version 6.04 (EpiInfo, CDC, Atlanta, GA). L'ensemble des souches étudiées a été dédoublonné.

Par site de prélèvement :

Pour le calcul de l'incidence des colonisations/infections, une seule souche isolée chez un même patient, a été retenue.

Par patient :

Une seule souche isolée par patient a été retenue pour le calcul de l'incidence des colonisés/infectés.

Les intervalles de confiance des incidences ont été calculés en utilisant la méthode quadratique de Fleiss (173).

Travaux

1. Etude 1 – Plaidoyer en faveur du dépistage de *Pseudomonas aeruginosa* dans les services de réanimation.

1.1. Présentation de l'étude

En avril 2009, la Société Française d'Hygiène Hospitalière publiait de nouvelles recommandations relatives à la prévention de la transmission croisée incluant un chapitre consacré au dépistage dans les services de réanimation. Dans ce document, il était largement recommandé de dépister *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline (SAMR) mais de ne dépister *Pseudomonas aeruginosa* (PA) que dans des situations bien définies. Or, en France, *P. aeruginosa* est le premier micro-organisme responsable d'infections nosocomiales dans les services de réanimation, sa prévalence y est plus de deux fois supérieure à celle de SAMR.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence d'une stratégie de dépistage globale privilégiant le dépistage du SAMR sur celui de PA en réanimation.

Ainsi, une étude rétrospective a été réalisée sur les données 2007 concernant les deux services de réanimation adulte du centre hospitalier universitaire de Besançon. Le dépistage de PA et du SAMR était effectué systématiquement à l'admission du patient et en cours d'hospitalisation de façon hebdomadaire. Les données concernaient les prélèvements à visée diagnostique positifs à PA et SAMR et les résultats des prélèvements de dépistage. Cette étude a été complétée d'une analyse de la littérature notamment des données de l'enquête nationale de prévalence de 2006 (ENP 2006) et des données de surveillance Réa- RAISIN.

1.2. Résultats

Au cours de l'étude, 900 patients ont été hospitalisés en réanimation adulte, parmi eux 753 ont bénéficié d'un dépistage de SAMR et 754 de dépistages de PA, soit 84 % des patients admis. Deux fois plus de patients étaient colonisés par PA à leur admission *versus* SAMR et la pression de colonisation des patients liée aux cas importés était 2,4 fois supérieure. La valeur prédictive positive du dépistage était 8,3 fois supérieure pour PA que pour SAMR.

L'incidence des infections à PA était plus de 3 fois supérieure à celle des infections à SAMR, quel que soit le site infectieux considéré. Les données de la littérature donnent une proportion de transmission croisée pour PA de l'ordre de 50 %.

1.3. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence le fait que la mise en place d'une stratégie de dépistage de PA en réanimation associée à des précautions complémentaires de type contact semble tout aussi pertinente que l'application de ces mesures pour SAMR.

1.4. Texte de l'article

Plaidoyer en faveur du dépistage de *Pseudomonas aeruginosa* dans les services de réanimation.

Plea in favour of *Pseudomonas aeruginosa* screening in intensive care units.

C. Slekovec, P. Cholley, M. Thouverez, X. Bertrand, D. Talon

Service d'Hygiène Hospitalière, CHU Besançon ; UMR 6249 Chrono-environnement,
Université de Franche-Comté

Titre court : Intérêt du dépistage de *P. aeruginosa* en réanimation

Auteur correspondant : Daniel Talon

Service d'Hygiène Hospitalière

CHU Jean Minjoz, 3 Bd Fleming, 25030 Besançon cedex

daniel.talon@univ-fcomte.fr

Résumé :

En Avril 2009, la Société Française d'Hygiène Hospitalière publiait de nouvelles recommandations relatives à la prévention de la transmission croisée incluant un chapitre consacré au dépistage dans les services de réanimation. Il y est largement recommandé de dépister SARM mais de ne dépister *Pseudomonas aeruginosa* que dans des contextes d'épidémie. Or en France, *P. aeruginosa* est le premier micro-organisme responsable d'infections nosocomiales dans les services de réanimation, sa prévalence y est plus de deux fois supérieure à celle de SARM. Dans ces services, la part de la transmission croisée comme source de *P. aeruginosa* peut-être évaluée à 50 % au regard des données de la littérature. Globalement, le nombre de cas acquis par transmission croisée est près de 3 fois supérieur pour *P. aeruginosa* que pour SARM alors que les précautions contact ne sont recommandées que pour SARM. En conclusion, l'application d'une stratégie de dépistage de *P. aeruginosa* en réanimation accompagnée de précautions complémentaires de type contact semble tout aussi pertinente que l'application de ces mesures pour SARM.

Mots Clés : *P. aeruginosa* ; *S. aureus* résistant à la méticilline ; Dépistage ; Transmission croisée

Abstract

In April 2009, the French Hospital Hygiene Society published new recommendations about cross-transmission prevention. One of the chapter was devoted to screening in intensive care units. Unlike MRSA screening, *Pseudomonas aeruginosa* screening is not recommended except in epidemic situations. Nowadays, *P. aeruginosa* is the first microorganism responsible for hospital acquired infections in French intensive care units. Its prevalence is 2 times higher than this of MRSA. In these units, according to data of the literature, the part of cross transmission as a source of *P. aeruginosa* can be estimated at 50%. On the whole, the number of cross-transmitted acquired cases is about 3 times higher for *P. aeruginosa* than for MRSA, while contact precautions are recommended only for MRSA. In conclusion, application of a *P. aeruginosa* screening policy in intensive care units associated with contact precautions seems to be as relevant as application of these measure to MRSA.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; Screening; Cross-transmission.

Introduction

La maîtrise des infections associées aux soins dans les établissements de santé repose sur la maîtrise technique des actes invasifs mais aussi sur la prévention de la transmission croisée. C'est dans ce cadre que la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH) a organisé un consensus formalisé d'experts associant différentes sociétés savantes, fédérations ou associations. Ce partenariat a abouti au document intitulé « Prévention de la transmission croisée : précautions complémentaires contact » publié en avril 2009 [1]. Ce dernier rassemble 118 recommandations regroupées en trois chapitres (politique générale, précautions standard et politique spécifique de la transmission croisée vis-à-vis de certains micro-organismes). Trente-neuf de ces recommandations (33%) concernent le seul dépistage alors même que l'une des questions essentielles posées par les experts était : est-il utile de proposer des précautions complémentaires ? Une autre question concerne les précautions standard, 'bien appliquées' ne suffiraient-elles pas à prévenir la transmission croisée des bactéries 'multi-résistantes' dans nos hôpitaux ? (cf. page 97 'politique générale' « Il n'y a pas de consensus sur une stratégie reposant uniquement sur les précautions standard... ») Or le dépistage n'est susceptible d'être utile que si des précautions complémentaires méritent d'être mises en place autour des patients colonisés. Ainsi pour SARM, les recommandations R45 (à l'admission en réanimation, il est recommandé de dépister SARM chez les patients à haut risque d'infection, notamment pour les dialysés chroniques, les porteurs de cathéter central de longue durée, les greffés hépatiques) et R46 (en cours de séjour en réanimation et à la condition où un dépistage a été effectué à l'admission, il est recommandé de dépister régulièrement les patients pour SARM) sont en faveur d'une politique de dépistage assez active.

Les recommandations relatives au dépistage de Pa, à savoir : R66 (s'il a été établi que l'incidence du portage est faible, il est fortement recommandé de ne pas mettre en place un dépistage pour Pa en réanimation), R67 (il est recommandé de dépister Pa à l'admission en réanimation : en situation d'épidémie récente avec notion de clonalité) et R68 (en dehors d'une situation épidémique, il est recommandé de ne pas mettre en place un dépistage régulier de Pa chez les patients au cours de leur séjour en réanimation) limitent, quant à elle, les indications du dépistage à des situations bien définies.

L'objectif de ce travail est d'évaluer au regard de la littérature et de notre expérience personnelle la pertinence d'une stratégie globale privilégiant le dépistage de SARM sur celui de Pa en réanimation.

Données de surveillance des infections acquises en réanimation

Parce qu'ils rassemblent des patients à fort risque infectieux et une utilisation très fréquente de dispositifs invasifs, les services de réanimation demeurent la discipline médicale où les infections nosocomiales sont les plus fréquentes avec 22,4 % des patients infectés le jour de l'enquête nationale de prévalence 2006 (ENP 2006) [2]. D'après cette même enquête, les 3 principaux types d'infection en réanimation étaient les pneumopathies, les bactériémies et les infections urinaires avec respectivement 43,2 %, 13,6 % et 11,9 % des infections. Le tableau 1 rapporte la part respective de *P. aeruginosa* et SARM dans ces trois principales pathologies avec des données de prévalence [2] et des données d'incidence (données Réa-RAISIN). Quelque soit le site infectieux étudié, la part d'infection attribuable à *P. aeruginosa* en réanimation est 3 à 4 fois supérieure à celle attribuable à SARM.

Données épidémiologiques : transmission croisée

SARM est le prototype de bactérie multi-résistante clonale et sa diffusion repose sur la transmission croisée, très principalement hospitalière, entre patients.

Identifiées au début des années 1960, les souches de SARM ont connu une distribution à l'échelle mondiale. Cette distribution n'est pas uniforme. En Europe, les données collectées au cours des années 1990-1991 révélaient un gradient croissant du nord vers le sud du continent [3]. L'épidémiologie moléculaire a démontré que la dissémination de SARM est un processus en constant remaniement avec des épisodes multiples de transmissions croisées qui tendent à propager de nouveaux clones épidémiques. Ces derniers peuvent en vertu de leur propriétés intrinsèques et des conditions environnementales supplanter les clones préexistants [4]. Les différents clones identifiés se propagent par bouffées épidémiques à l'échelle d'une région, d'un pays ou d'un continent [5, 6] et à un moment donné au sein d'un établissement de santé la majorité des patients colonisés/infectés le sont par un même clone [7, 8].

Concernant *P. aeruginosa*, l'importance relative de l'origine endogène et de la transmission croisée varie considérablement en fonction des services de soins. Les différences observées entre les services peuvent être expliquées par des différences dans l'application de mesures générales d'hygiène, des pratiques d'antibiothérapie et des différences dans le recrutement des patients [9-12]. Toutefois, en moyenne, un taux de transmission croisée de l'ordre de 50% dans les services de réanimation adulte peut être retenu à la lumière des données publiées et récapitulées dans le tableau 2.

Intérêt du dépistage : illustration à un niveau local

Le CLIN du CHU de Besançon recommande de procéder au dépistage systématique du SARM et de *P. aeruginosa* lors de l'admission des patients en service de réanimation puis toutes les semaines à jour fixe. Pour l'année 2007, parmi les 900 patients admis dans les deux services de réanimation adulte médicale et chirurgicale, 753 patients ont bénéficié de dépistages de SARM et 754 de dépistages de *P. aeruginosa*, soit 84 % des patients admis. Les résultats de ces dépistages sont renseignés dans le tableau 3.

Les colonisations (prélèvements de dépistage positif) et les infections (prélèvements à visée diagnostique positif, de type hémoculture, lavage broncho-alvéolaire et examen cyto-bactériologique des urines), ont été considérées comme acquises lorsqu'elles survenaient plus de 48h après l'admission du patient dans le service, en deçà de ce délai elles étaient considérées comme importées. Les valeurs prédictives positives et négatives du dépistage par rapport au risque individuel infectieux des patients ont été calculées et sont présentées en complément dans le tableau 3. Au total, la pression de colonisation liée aux cas colonisés importés et la valeur prédictive positive du dépistage sont très supérieures pour Pa que pour SARM.

Discussion

La SFHH insiste, à travers ses recommandations, sur l'intérêt du dépistage de SARM en réanimation mais apparaît en retrait quant à l'intérêt du dépistage de Pa dans ces mêmes services. Selon ces recommandations, l'utilité du dépistage peut être double : d'une part appliquer des précautions complémentaires de type contact pour prévenir le risque de transmission croisée et d'autre part prévenir le risque infectieux 'endogène' chez un patient dépisté positif. Un troisième intérêt potentiel existe même s'il n'apparaît pas dans le document : orienter le traitement lorsque l'infection survient, soit vers un traitement ne prenant pas en compte la résistance si le patient est négatif au dépistage (préservation des antibiotiques), soit au contraire vers un traitement d'emblée 'efficace' chez un patient dépisté porteur (efficacité bactéricide plus rapide). Au vu des différentes données (fréquence des infections, part de la transmission croisée, fréquence et valeurs prédictives positive et négative de la colonisation), il apparaît difficile aujourd'hui, selon nous, de renoncer au dépistage de Pa à l'admission et en cours de séjour en réanimation en privilégiant le seul dépistage de SARM.

Que ce soit à travers l'enquête de prévalence ou des données d'incidence Réa-RAISIN, les données de la littérature s'accordent en faveur d'un rôle plus important de Pa que de SARM dans les infections en réanimation. Il est vrai que la fréquence des infections à SARM dans ces services a beaucoup diminué au cours des dernières années en France. Ce qui est sans doute dû à une stratégie incluant un dépistage large des patients [13]. Aussi serait-il dommage de ne pas poursuivre une telle politique dont l'efficacité a été démontrée. Mais, face à ce succès, ne serait-il pas possible de l'étendre à la maîtrise de Pa ? En effet, la fréquence de ces infections, l'acquisition fréquente de résistance rendant le traitement des infections à Pa difficile ainsi que l'importante mortalité lors de pneumopathies, représentent des arguments complémentaires en faveur d'une stratégie active [14, 15].

Le typage moléculaire permet de préciser la place de la transmission croisée dans l'épidémiologie des grandes espèces bactériennes responsables d'infections en réanimation [16]. Mais celui-ci trouve ses limites pour des espèces à large dissémination clonale comme SARM alors qu'il conserve toute sa valeur interprétative pour Pa, espèce pour laquelle les épidémies clonales sont essentiellement locales ou loco-régionales. Les limites du typage moléculaire de type 'électrophorèse en champ pulsé' pour SARM nous empêchent dans de nombreuses situations de confirmer/infirmier l'acquisition de la bactérie dans le service de réanimation et le caractère clonal des souches est alors susceptible de surévaluer la transmission croisée au sein du service. A l'inverse le caractère très discriminant de cette technique chez Pa permet d'avoir une grande certitude sur les cas d'acquisition [17]. En pratique, la différence observée du rôle de la transmission croisée entre ces deux espèces (100% *versus* 50%) au sein des services de réanimation est probablement surévaluée. De ce point de vue, le dépistage de Pa paraît aussi légitime que celui de SARM. D'autant plus que le nombre absolu d'infections à Pa, attribuables à une transmission croisée, apparaît plus important que celui lié à SARM (19 *versus* 1 selon nos données locales, tableau 3).

Nos données locales montrent que le nombre de patients colonisés par Pa à leur admission en réanimation, constituant ainsi un réservoir potentiel de transmission croisée, est plus de quatre fois supérieur au nombre de patients positifs à SARM. Si l'on considère les patients dépistés positifs en cours d'hospitalisation (incluant donc les dépistés faussement-négatifs à l'admission mais aussi pour bon nombre d'entre eux des vraies acquisitions par transmission croisée), leur nombre devient 6 fois supérieur pour Pa que pour SARM (111 *versus* 17, tableau 3). Il faut noter que ces acquisitions de Pa en réanimation se font nécessairement à travers un soin, même si l'environnement, notamment hydrique, peut jouer un rôle de réservoir secondaire [18, 19]. Nos données étant rétrospectives, l'identité clonale entre les

souches de Pa colonisatrices et infectantes n'a pas pu être confirmée. Cependant différentes équipes ont montré qu'il y avait, dans une proportion variant de 80 à 100%, une identité clonale entre ces souches. Une seule étude, celle de Valles et al. [20] va à l'encontre de cette affirmation. En se basant sur cette hypothèse de fréquente identité clonale, nos données montrent que la valeur prédictive positive du dépistage de Pa est très supérieure à celle de SARM.

Les données épidémiologiques qu'elles soient nationales ou locales et la connaissance de la part de la transmission croisée dans l'acquisition d'infection sont en faveur d'un dépistage généralisé de Pa en réanimation. Même en l'absence de techniques validées de décolonisation de Pa, nos données locales suggèrent un intérêt réel du dépistage à la fois sur un plan collectif, dans le cadre de la prévention de la transmission croisée, et de la préservation des antibiotiques anti-pyocyaniques et sur un plan individuel avec un possible amélioration de la prise en charge des infections à Pa qui surviennent chez des patients préalablement dépistés positifs [21].

En conclusion, l'application d'une stratégie de dépistage systématique de *P. aeruginosa* en réanimation associée à des précautions complémentaires de type contact semble tout aussi pertinente que l'application de ces mesures pour SARM. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour valider l'efficacité de cette stratégie dans la réduction du risque infectieux lié à *P. aeruginosa* dans les services de réanimation.

Références :

1. SFHH. Prévention de la transmission croisée: précautions complémentaires contact. HYGIENES. 2009.
2. InVS. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, 2006
3. Voss A, Doebbeling BN. The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 1995;5(2):101-6.
4. Ayliffe GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 1997;24 Suppl 1:S74-9.
5. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):2912-7.
6. EARSS. [cited 05-2010]; Available from: <http://www.rivm.nl/earss/>.
7. Bertrand X, Mouchot L, Jebabli M, Bajolet O, Aho S, Blech MF, et al. Trends of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae-producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in eastern France: a three-year multi-centre incidence study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(11):1113-7.
8. Bertrand X, Thouverez M, Talon D. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in eastern France. *J Hosp Infect*. 2000;46(4):280-7.
9. Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1212-9.
10. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmoniere P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2003;53(4):274-82.
11. Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, et al. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis*. 2004;38(5):670-7.
12. Bertrand X, Thouverez M, Patry C, Balvay P, Talon D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7(12):706-8.
13. Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, Fournier S, Carbonne A, Marty L, et al. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med*. 2010;170(6):552-9.
14. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospe R, Venet C, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001;27(3):503-12.

15. Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. [*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2003;22(6):505-9.
16. Grundmann H, Barwolff S, Tami A, Behnke M, Schwab F, Geffers C, et al. How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Crit Care Med.* 2005;33(5):946-51.
17. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2001;27(8):1263-8.
18. Ortega B, Groeneveld AB, Schultsz C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(10):825-31.
19. Rogues AM, Boulestreau H, Lasheras A, Boyer A, Gruson D, Merle C, et al. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2007;67(1):72-8.
20. Valles J, Mariscal D, Cortes P, Coll P, Villagra A, Diaz E, et al. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004;30(9):1768-75.
21. Slekovec C, Navellou JC, Blasco G, Thouverez M, Bertrand X, Talon D. [Is surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* carriage in intensive care units useful?]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2010;29(4):279-82.
22. Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, et al. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax.* 1998;53(12):1053-8.
23. Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OC, Nataro JP, et al. The role of patient-to-patient transmission in the acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit. *J Infect Dis.* 2009;200(6):900-5.

Conflit d'intérêts : aucun

Tableau 1. Parts respectives du staphylocoque doré résistant à la méticilline (SARM) et de *P. aeruginosa* (Pa) dans les principales pathologies infectieuses acquises en réanimation, données de prévalence et d'incidence.

	SARM		<i>P. aeruginosa</i>		p
	n	%	n	%	
Données ENP 2006					
Infections totales en réanimation (n = 1673)	105	6,3	271	16,2	<0,001
Pneumopathies (n = 721)	57	7,9	161	22,3	<0,001
Bactériémies (n = 226)	22	9,7	27	11,9	0,45
Infections urinaires (n = 198)	7	3,5	28	14,1	<0,001
Données Réa-RAISIN 2008 CCLIN Sud-Est					
Infections totales (n = 4991)	190	3,8	734	14,7	<0,001
Pneumopathies (n = 2136)	122	5,7	411	18,0	<0,001
Bactériémies (n = 857)	37	4,3	90	10,5	<0,001
Infections urinaires (n = 1110)	6	0,6	157	14,2	<0,001
Données Réa-RAISIN 2009 CCLIN Est					
Infections totales (n = 999)	35	3,5	160	16,0	<0,001
Pneumopathies (n = 488)	24	4,3	93	19,1	<0,001
Bactériémies (n = 165)	6	3,6	17	10,3	0,02
Infections urinaires (n = 92)	1	2,5	31	16,1	<0,001

Tableau 2. Revue des publications relatives au taux de transmission croisée chez *P. aeruginosa*.

Auteurs	Etablissement	Nombre de patient inclus dans l'étude	Nombre de cas acquis	Nombre de cas exogène	Taux de transmission croisée (%)
Ortega et al. [18]	Hôpital universitaire Amsterdam Pays-Bas	436	18 (dont 14 typés)	9	64
Berthelot et al. [14]	CHU St-Etienne France	59	9	5	55,6
Bertrand et al. [15]	CHU Besançon France	1646	237 (dont 155 typés)	83	53,5
Bergmans et al. [22]	Hôpital universitaire Maastricht Pays-Bas	100	24	10	41,7
Rogues et al. [19]	CHU Bordeaux France	415	36	15	41,7
Johnson et al. [23]	Centre Médical Universitaire du maryland Etats-Unis d'Amérique	7071	149	46	31
Bonten et al. [9]	Hôpital universitaire Maastricht Pays-Bas	297	50 (dont 44 typés)	10	22,7

Tableau 3. Résultat des dépistages menés dans les services de réanimation médicale et chirurgicale du CHU de Besançon en 2007.

	SARM	<i>P. aeruginosa</i>
Nombre de patients dépistés	753	754
Nombre de patients dépistés positifs n (%)	31 (4,1)	146 (19,4)
- à l'admission n (%)	14 (45,2)	35 (24,0)
- en cours d'hospitalisation n (%)	17 (54,8)	111 (76,0)
Nombre de patients infectés n (%)	4 (0,5)	61 (8,1)
- à l'admission n (%)	2 (50,0)	9 (14,8)
- en cours d'hospitalisation n (%)	2 (50,0)	52 (85,2)
- préalablement dépistés positifs n (%)	1 (50,0)	33 (63,5)
- préalablement dépistés négatifs n (%)	1 (50,0)	19 (36,5)
VPP % (IC 95 %)	3,2 (0,2 – 18,5)	26,6 (19,3 – 35,4)
VPN % (IC 95 %)	99,6 (98,7 – 99,9)	95,6 (93,6 – 97,0)

2. Etude 2 - Rôle des points d'eau comme réservoirs de contamination des patients par *Pseudomonas aeruginosa* dans les services de réanimation.

1.1. Présentation de l'étude

Le but de notre étude était de faire le point sur le rôle de l'environnement hydrique dans la contamination par *Pseudomonas aeruginosa* des patients hospitalisés en réanimation, en absence de toute épidémie identifiée. Pour cela une étude prospective a été menée durant 8 semaines entre le 20 février et le 10 avril 2006. Elle concernait les deux services de réanimation adulte du centre hospitalier universitaire de Besançon. Des prélèvements d'environnements (siphon et robinet) ont été réalisés au niveau des points d'eau des chambres de façon hebdomadaire, indépendamment du statut des patients par rapport à *P. aeruginosa*. Le statut des patients par rapport à la colonisation/infection par *P. aeruginosa* a été suivi par la réalisation, en plus des prélèvements à visée diagnostique, de prélèvements de dépistage de chaque patient à l'admission puis de façon hebdomadaire. L'isogénicité des souches cliniques et environnementales a été recherchée par détermination des profils de macrorestriction de l'ADN total par l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

2.2. Résultats

Au cours de l'étude, 123 patients ont été admis en hospitalisation complète en réanimation. Parmi eux, 17 patients ont présenté au moins un prélèvement positif à *P. aeruginosa*, pour un total de 63 prélèvements. Sur les 224 prélèvements de siphons, 193 étaient positifs à *P. aeruginosa*, et 10 sur les 224 prélèvements de robinets. Le typage moléculaire par PFGE des souches cliniques a donné 17 clones, dont un seul clone incluait des souches isolées chez 2 patients. Les 203 souches environnementales se répartissaient en 82 génotypes majeurs, 54 étaient des clones uniques et les 28 autres étaient des clones multiples. Seuls deux clones multiples incluait à la fois des souches cliniques et environnementales. La cinétique de colonisation/infection a montré qu'un seul patient sur les 14 évaluables a été infecté par un clone présent préalablement dans l'environnement hydrique de sa chambre.

2.3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons pu constater que les siphons des chambres de réanimation sont fortement contaminés par *P. aeruginosa*. La clonalité des souches au niveau des points d'eau est en faveur d'une contamination rétrograde *via* le biofilm et non d'une contamination à partir de l'eau du réseau. Finalement, si le rôle de l'environnement hydrique sur l'acquisition de *P. aeruginosa* par les patients hospitalisés en réanimation est indiscutable, la part attribuable semble plus faible, hors situation épidémique, que celle attendue par de nombreuses équipes opérationnelles d'hygiène hospitalière.

2.4. Texte de l'article

Pascal Cholley
Michelle Thouverez
Nathalie Floret
Xavier Bertrand
Daniel Talon

The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*

Received: 2 November 2007
Accepted: 12 March 2008
Published online: 19 April 2008
© The Author(s) 2008

P. Cholley · M. Thouverez · N. Floret ·
X. Bertrand · D. Talon (✉)
CHU Jean Minjoz, Service d'Hygiène
Hospitalière,
Bd Fleming, 25030 Besançon Cedex,
France
e-mail: daniel.talon@univ-fcomte.fr
Tel.: +33-3-81668286
Fax: +33-3-81668914

Abstract Objective: To assess the role of the water environment in the *Pseudomonas aeruginosa* colonization of patients in intensive care units in the absence of a recognized outbreak. **Design and setting:** Prospective, single-centre study over an 8-week period in two adult ICUs at a university hospital. Environmental samples were taken from the water fittings of rooms once per week, during a 8-week period. Patients were screened weekly for *P. aeruginosa* carriage. Environmental and humans isolates were genotyped by using pulsed-field gel electrophoresis. **Results:** *P. aeruginosa* was detected in 193 (86.2%) of the 224 U-bend samples and 10 of the 224 samples taken

from the tap (4.5%). Seventeen of the 123 patients admitted were colonized with *P. aeruginosa*. Only one of the 14 patients we were able to evaluate was colonized by a clone present in the water environment of his room before the patient's first positive sample was obtained. **Conclusion:** The role of the water environment in the acquisition of *P. aeruginosa* by intensive care patients remains unclear, but water fittings seem to play a smaller role in non-epidemic situations than expected by many operational hospital hygiene teams.

Keywords Water fittings · *Pseudomonas aeruginosa* · Environment · Acquired infections · Intensive care

Introduction

In the past few decades, *Pseudomonas aeruginosa* has become a major hospital pathogen, due to both the number and severity of the infections it causes. A national prevalence survey indicated that *P. aeruginosa* was responsible for 10% of all nosocomial infections in France, only slightly fewer than *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [1]. In the hospital setting, intensive care units (ICUs) have a high endemic potential for this bacterium, which causes 18% of nosocomial infections in such units, versus only 6% in surgical and non-surgical units [2]. In many departments, *P. aeruginosa* is frequently involved in broncho-pulmonary infections and, to a lesser extent, urinary infections, infections of surgical sites, and bacteremia. The severity and excess mortality observed in cases of pulmonary infection and bacteremia are due to a combination of the intrinsic properties of the bacte-

ria – virulence factors and the natural resistance to antibiotics – and the immunocompromized status of the infected patients [3].

P. aeruginosa is an environmental bacterium. It exists as a saprophyte on damp soil, plant material, and in freshwater, wastewater, and seawater [4]. It is independent of humans but may be found as a commensal organism in the digestive tract. *P. aeruginosa* is rarely carried by subjects in good health, being found in only 2–10% of individuals, whereas it may be found in 50–60% of hospitalized patients, particularly on burns and scabs. The survival of *P. aeruginosa* seems to be particularly favored by damp environments, such as sinks, taps, shower heads, and other water fittings [5, 6]. This enables this bacterium to contaminate medical and surgical equipment, hospital fittings, and other material [7]. Numerous hospital outbreaks have been blamed on the colonization of diverse items of equipment and/or damp materials [8, 9]. As a re-

sult, many hospital hygiene teams place great emphasis on the role of water in all infections with *P. aeruginosa*, particularly those occurring in ICUs in the absence of an outbreak.

The aim of this study was to evaluate the role of the water environment on the colonization of patients hospitalized in ICUs in the absence of a recognized epidemic.

Materials and methods

Background

This study was carried out in the two adult ICUs (one surgical and one medical) at Besançon University Hospital. Each of these two units has 15 beds, all of which are in individual rooms for the surgical ICU, with two double rooms for the medical ICU. This study was carried out (collection of data and strains) over 8 weeks, from 20 February to 10 April 2006. It was approved by the hospital's review board.

Design of the study

Environmental samples were taken weekly from the water fittings of the rooms, regardless of the *P. aeruginosa* infection status of the patients in the rooms. *P. aeruginosa* colonization status was monitored by testing samples taken for diagnostic purposes and samples taken weekly for screening purposes. We tested for isogenicity between clinical and environmental samples by determining macrorestriction profiles of total DNA, by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Clinical samples

The clinical samples tested were taken for diagnostic and epidemiological (screening) purposes. Diagnostic samples were not taken systematically: they were taken only if there were clinical reasons to suspect infection, and the sampling site was chosen according to the site of suspected infection. Screening samples were taken systematically on admission of the patient to the ICU and once per week thereafter, throughout the patient's stay. They were taken from the nose, the rectum, and from tracheal aspirates. Colonization was defined as a positive result for at least one sample.

Environmental samples

Two types of environmental samples were taken once per week from the water fittings in each intensive care room: 10 ml of water from the U-bend under the sink and 150 ml

of cold water taken directly from the tap immediately after activating. The various volumes of water sampled were collected into sterile flasks containing sodium thiosulphate to inhibit the effects of water chlorination.

Culture

Diagnostic samples were plated on agar Columbia broth supplemented with 5% horse blood. Screening samples were plated on agar Mueller-Hinton broth. Environmental samples were plated on cefrimide agar after filtration and 24 h enrichment in trypticase-soy (TS) broth. Cefrimide agar plates were incubated for 72 h at 41°C.

Identification

Cefrimide agar is selective for *P. aeruginosa*, but other bacterial species may nevertheless develop. Identification of *P. aeruginosa* was based on positive oxidase activity, resistance to kanamycin, growth at 41°C and not at 4°C, and confirmed by biochemical tests (ID 32 GN, Biomérieux, Marcy l'Étoile, France).

Genotyping

Isolates were typed by determination of their total DNA macrorestriction profile (pulsotype) following digestion with *DraI* (Boehringer, Mannheim, Germany) as assessed by PFGE (CHEF DRIII, Bio-Rad Ivry sur Seine, France), according to a technique previously developed by our laboratory [10]. We used Gel-Compar (Applied Math, Kortrijk, Belgium) to establish a similarity matrix for the DNA based on calculation of the Dice coefficient (pairwise comparison of strains). A dendrogram was generated with the UPGMA (unweighted pair group using arithmetic means) hierarchical algorithm. We compared gels using *S. aureus* NCTC 8325 as a reference strain. Typing results were interpreted according to international recommendations [11].

Definitions

Clones including clinical isolates were defined as sporadic if they were isolated from only a single patient, microepidemic if they were found in two or three patients, and epidemic if from more than three patients. Clones including environmental isolates were defined as unique if the isolates were found in a single room and multiple if the isolates were present in several rooms.

Statistical analysis

The data were analyzed with EpiInfo version 6.04 (Epi-Info, CDC, Atlanta, GA, USA). Confidence intervals were calculated by the quadratic method of Fleiss.

Results

Incidence of colonization/infection

In total, 123 patients were admitted to the two ICUs (69 to the medical unit and 54 to the surgical unit) for a total of 1416 days of hospitalization (720 in the medical unit and 696 in the surgical unit). Seventeen patients (8 in the medical unit and 9 in the surgical unit) presented at least one sample positive for *P. aeruginosa*. The overall incidence of colonization was 13.8 (range 8.5–21.5) per 100 patients admitted: 11.6 (range 5.5–22.1) for the medical unit and 16.66 (range 8.4–29.8) for the surgical unit. The overall incidence density was 12.0 (range 7.2–19.6) per 1000 days of hospitalization: 11.1 (range 5.9–22.7) for the medical unit and 12.93 (range 8.3–25.3) for the surgical unit. In total, 63 samples tested positive for *P. aeruginosa*: 46 screening samples from 16 patients and 17 diagnostic samples from 7 patients.

Positivity of the water environment

In total, 448 samples were taken from both ICUs. *P. aeruginosa* was detected in 193 (86.2%) of the 224 U-bend samples and 10 of the 224 samples taken from the tap (4.5%; Table 1). More than half the samples taken from U-bends contained more than one strain of *P. aeruginosa*, with some samples containing up to four strains. Permanent colonization of the U-bend was observed in five of the 28 rooms. Two of these rooms were in the surgical ICU and the other three were in the medical ICU.

Molecular typing

The clinical isolates belonged to 17 clones. Sixteen of these 17 clones were sporadic (isolated from a single patient), and one clone was microepidemic including isolates from two patients. We typed 203 environmental isolates in all. These 203 environmental isolates belonged to 82 pulsotypes – 37 present in the medical ICU, 33 in the surgical ICU and 12 in both units; 54 of these 82 pulsotypes were isolated only once – 29 in the medical unit and 25 in the surgical unit – and the other 28 pulsotypes were multiple. Eight of these strains were present in the medical unit, 8 in the surgical unit, and

Table 1 Positive results (and numbers of clones) for samples taken from U-bends

	Room	Date	27 Feb	6 Mar	13 Mar	20 Mar	27 Mar	3 Apr	10 Apr	
Medical intensive care unit	A1	1 ^a	2	2 ^a	3	2 ^a	0	1	3	
	A2	1	3	2	2	1	2	2	0	
	A3	1	1	1	2	2	2	2	2	
	A4	1	1	3	3	3	1	0	2	
	A5	1	1	2	3	3	1	1	2	
	B1	1	3	2	1	2	2	1	2	
	B2	1 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	1	3	0	
	B3	1	3	1	3	2	2	2	2	
	B4	1	1	3	0	4	2	2	0	
	B5	1	1	2	2	1	1	2	0	
	C1	1	1	4	2	2	0	3	2	
	C2-3	1	3	3	3	3	3	2	0	
	C4-5	1	2	4	3	2	0	1	2	
	Surgical intensive care unit	A1	1	2	1	3	2	0	1	0
		A2	1	2	3	2	2	4	0	2
A3		1	3	1	2	1	0	1	2	
A4		1	2	2	1	2	3	2	2	
A5		1	2	1	3	2	2	1	3	
A6		1	2	3	2	2	0	2	0	
A7		1	2	2	3	2	0	1	0	
B1		1	2	2	2	3	1	2	0	
B2		1	1	2	2	2	2	0	0	
B3		1	1 ^a	0	2	1	1	2	0	
B4		1	3	1	2	3	2	1	2	
C1		1	0	4	2	2	1	0	1	
C2		0	0	2	2	2	1	3	2	
C3		1	3	1	2	3	1	2	0	
C4		1	0	3	2	1 ^a	0	1	0	

^a One positive sample from taps

Table 2 Timing of the colonization/infection of patients with respect to the timing of positive results for environmental samples from the water fittings

Patient no.	Clone no. First positive environmental sample	First clinical sample	Second environmental sample
1	Abs ^a	43	61
2	9, 48	23	5
3	43	43	43
4	43	34	31, 43
5	66	42	— ^b
6	42	40	— ^b
7	Abs ^a	7	41, 104
8	71	37	42, 64
9	Abs ^a	2	40, 42, 76
10	29	18	20, 38
11	42, 90	36	42
12	2	13	2, 10, 38
13	10, 27	31	10, 27
14	43	22	— ^b
15	42, 101	65	42
16	2, 66	12, 103	67
17	31, 32, 74	35	— ^b

^a Absence of environmental sample

^b Negative environmental sample

12 were present in both units (Table 1). Only two multiple clones included both clinical and environmental isolates: one was isolated from 7 environmental samples and 1 patient, and the other was isolated from 8 environmental samples and 2 patients. The time course of colonization was investigated by considering the timing of the clinical and environmental samples taken for the 17 patients colonized with *P. aeruginosa* (Table 2). Only 1 patient was colonized with a clone present in the water environment of his room before he gave his first positive sample. In the 3 cases without environmental sample E1, the environment perhaps acted as a reservoir, too. The environment was therefore a possible reservoir for the colonization of patients in 1 of 14 cases. In half the cases, the water environment (U-bends and taps) of the room contained several clones of *P. aeruginosa*. For a given water fitting, in 9 cases of 10, the tap and the U-bend were colonized with identical clones.

Discussion

In this study, the incidence of colonization by *P. aeruginosa* was high, but molecular typing showed that there was no clonal outbreak. This high incidence was revealed by identification of simple colonization through testing screening samples. If diagnostic samples only had been used, the measured incidence would have been about half that reported. The water environment played only a minor role because only one of the 14 cases that could be evaluated was consistent with a colonization from the water sources tested (7.2% of cases).

Testing samples taken from water fittings in surgical and medical intensive care rooms in this study showed, nevertheless, that U-bends were frequently contaminated with *P. aeruginosa*, consistent with published findings [5, 6, 12, 13]. In half the cases, the water environment (U-bends and taps) of the room contained several clones of *P. aeruginosa*. This, together with the clonal diversity of the strains isolated from U-bends (differences between and within U-bends), provides evidence for colonization of the U-bend from the exterior rather than originating from the water supply. In addition, the presence of identical strains in the U-bends of sinks in both these physically independent units not shared by the same patients is suggestive of retro-colonization of the U-bend by the microflora present in wastewater pipes, via the biofilm, as previously proposed [14].

The role of the water environment in the *P. aeruginosa* colonization of patients was the key issue in this study. Many studies have attributed a major role to water fittings in the incidence of patient colonization with *P. aeruginosa* in ICUs [5, 12, 14]. Other studies have reported only a weak epidemiological link between environmental colonization and the occurrence of infections in patients [4, 15, 16]. All these previous studies were carried out during outbreaks. Some prospective studies have been published and they report frequencies of patient colonization by the environment of 14.2–50% [3, 6, 12–14, 17, 18]. In our study, in the absence of clonal epidemic, the frequency of colonization of patients via the water environment of their rooms seemed to be lower. Regardless of the epidemiological situation, which may differ between departments, measurement of the frequency with which

this event arises requires three methodological conditions which have never before been fulfilled:

1. The identification of all patients colonized by epidemiological sampling (screening) of patients. We found that the use of diagnostic samples alone would have identified only about half the colonized/infected patients.
2. The collection of samples from water fittings should be generalized and carried out regularly to make it possible to determine when the patients became infected or colonized. This is rarely the case in surveys motivated by the suspicion of an epidemic.
3. Strain comparisons should be based on a highly reproducible and discriminant typing method. The determination of the total DNA macrorestriction profile by PFGE can be considered to be the gold standard method for typing [10, 19].

The frequency of strains widely present in the environment (multiple clones) but never isolated from patients was high. Observations of this type led Valles et al. to suggest that there may be two different genetic groups in

this species: one group of strains that are mostly environmental and not very pathogenic in humans; and one group of strains better adapted to humans with a much higher pathogenic potential [13]. This view is supported by virulence surveys, analyses of bacterial populations by multi-locus sequence typing, and the application of several typing methods to strains of two different origins (clinical and environmental) [4, 20, 21].

Conclusion

In conclusion, although water fittings clearly play a role in the acquisition of *P. aeruginosa* by patients hospitalized in ICUs, the contribution of this phenomenon in non-epidemic situations appears to be much smaller than generally believed by many operational hospital infection control teams.

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

1. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006. (2007) Résultats préliminaires au 12/01/2007. Institut de veille sanitaire (InVS). available at <http://www.invs.sante.fr>
2. Bertrand X, Thouverez M, Patry C, Balvay P, Talon D (2001) *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. Clin Microbiol Infect 7:706–708
3. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospe R, Venet C, Carricajo A, Aubert G, Ros A, Dumont A, Lucht F, Zeni F, Auboyer C, Bertrand JC, Pozzetto B (2001) Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. Intensive Care Med 27:503–512
4. Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M (2004) Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. Arch Med Res 35:251–257
5. Lasheras A, Guisset O, Boulestreau H, Rogues AM, Fiore M, Szajner S, Bezan MC, Gabinski C, Gachie JP (2006) Reservoirs and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit. Med Mal Infect 36:99–104
6. Blanc DS, Nahimana I, Petignat C, Wenger A, Bille J, Francioli P (2004) Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. Intensive Care Med 30:1964–1968
7. Schelenz S, French G (2000) An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of bronchoscopes and an endoscope washer-disinfector. J Hosp Infect 46:23–30
8. Cobben NA, Drent M, Jonkers M, Wouters EF, Vanechoutte M, Stobberingh EE (1996) Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. J Hosp Infect 33:63–70
9. Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N (1998) Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. J Hosp Infect 39:53–62
10. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y (1996) Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect 32:135–145
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33:2233–2239
12. Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V, Ruhke M (2001) Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. Infect Control Hosp Epidemiol 22:49–52
13. Valles J, Mariscal D, Cortes P, Coll P, Villagra A, Diaz E, Artigas A, Rello J (2004) Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med 30:1768–1775
14. Trautmann M, Lepper PM, Haller M (2005) Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. Am J Infect Control 33:S41–S49

15. Talon D, Mulin B, Rouget C, Bailly P, Thouverez M, Viel JF (1998) Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 157:978–984
16. Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE (1999) Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1212–1219
17. Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, Trautmann M (2002) Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med* 30:2222–2228
18. Ferroni A, Nguyen L, Pron B, Quesne G, Brusset MC, Berche P (1998) Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect* 39:301–307
19. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie JH (1999) Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol* 37:3654–3661
20. Fenner L, Richet H, Raoult D, Papazian L, Martin C, La Scola B (2006) Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebal coculture test? *Crit Care Med* 34:823–828
21. Vernez I, Hauser P, Bernasconi MV, Blanc DS (2005) Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:29–35

3. Etude 3 – Epidémiologie moléculaire des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistantes dans un hôpital universitaire Français.

3.1. Présentation de l'étude

Dans nos hôpitaux, on observe une circulation de plus en plus importante de souches multi-résistantes, pour lesquelles les options thérapeutiques s'avèrent très limitées. Ce travail avait deux objectifs : 1) évaluer l'incidence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant (MDR-PA) dans les différents services de soins du CHU de Besançon, et 2) caractériser les souches par une technique de génotypage afin de préciser la part de la dissémination clonale dans l'émergence de cette multi-résistance.

Pour cela une étude prospective a été menée entre octobre 2007 et septembre 2008. Tous les isolats de prélèvements à visée diagnostique et épidémiologique (dépistage) ont été collectés, à l'exception de ceux des patients atteints de mucoviscidose. Les prélèvements épidémiologiques (nez, rectum et aspiration trachéale pour les patients ventilés) étaient réalisés de façon systématique, dès l'admission du patient et répétés une fois par semaine tout au long de l'hospitalisation. Ce type de prélèvement était effectué uniquement chez les patients hospitalisés dans les services de réanimation. L'antibio-résistance de ces isolats a été évaluée contre 13 molécules antitypocyaniques (ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique, pipéracilline/tazobactam, aztréonam, ceftazidime, céfépime, imipénème, méropénème, ciprofloxacine, gentamicine, tobramycine, amikacine et colistine).

Les souches ont été sélectionnées en fonction de leurs profils de résistance. Seules les souches résistantes ou intermédiaires à tous les antibiotiques testés, ou les souches sensibles à un seul antibiotique autre que la colistine, ont été incluses dans l'étude. Les analyses effectuées incluaient la détection phénotypique des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) par le test de synergie, l'identification des gènes *bla* codant pour les BLSE (PCR et séquençage) et le génotypage (PFGE). L'ensemble des souches a fait l'objet d'un dédoublement, une seule souche isolée par patient et par site de prélèvement.

3.2. Résultats

Durant la période d'étude 60 454 patients ont été admis en hospitalisation complète. Parmi eux, six cent cinquante quatre patients ont présenté au moins un prélèvement positif à *P. aeruginosa* et pour 38 d'entre eux (5,8%) la souche était MDR, soit un taux d'incidence de 0,1/1000 patients-jours pour les prélèvements à visée diagnostique. Sur les 38 patients, deux étaient positifs à l'admission (≤ 48 heures) à MDR-PA, les 36 autres présentaient un délai moyen d'acquisition d'une souche MDR-PA de 41 jours et parmi eux 13 étaient d'emblée positifs à MDR-PA. La détection de BLSE et l'identification des gènes *bla* étaient négatives. Deux isolats produisaient une oxacillinase acquise (OXA-14 et OXA-28) et les 36 autres étaient considérés comme hyperproducteurs d'AmpC. Les 38 isolats dédoublonnés ont donné 12 pulsotypes, dont un incluait 15 patients (clone épidémique majeur ; D) et trois incluaient quatre isolats chacun (clones micro-épidémiques ; A, G et J). L'analyse spatio-temporelle des cas colonisés/infectés par le clone D montrait l'absence de lien entre les cas et la comparaison des profils des clones épidémiques et micro-épidémiques avec notre base de données locale montrait la présence antérieure de ces clones dans notre établissement avec des phénotypes non-MDR.

3.3. Conclusion

Dans notre étude, l'apport des prélèvements à visée épidémiologique en réanimation était important dans l'identification de l'ampleur de l'épidémie puisque, à travers ces prélèvements systématiques, plus d'un tiers des patients était colonisé/infecté par une souche MDR-PA épidémique. Finalement, ces résultats suggèrent que les clones MDR-PA émergent principalement, à la faveur de la pression de sélection antibiotique parmi des clones de *P. aeruginosa* endémiques moins résistants qui diffusent au sein de notre hôpital par transmission croisée. La priorité devrait être donnée à l'amélioration de l'observance des précautions standard.

3.4. Texte de l'article

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/jhin

Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital

P. Cholley^{a,b}, H. Gbaguidi-Haore^{a,b}, X. Bertrand^{a,b,c}, M. Thouverez^{a,b}, P. Plésiat^{c,d},
D. Hocquet^{c,d}, D. Talon^{a,b,c,*}

^a Service d'Hygiène Hospitalière Centre Hospitalier Universitaire Besançon, France

^b UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche-Comté, France

^c Centre National de Référence-Résistance chez *P. aeruginosa*, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, France

^d Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2009

Accepted 18 June 2010

Available online xxx

Keywords:

Epidemiology

Genotyping

Multidrug resistance

Pseudomonas aeruginosa

SUMMARY

The aim of this study was to assess the incidence and molecular epidemiology of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* in our university hospital. Analysis included antimicrobial susceptibility profiling, *bla* gene identification and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). During the one-year study, 654 patients had at least one sample that tested positive for *P. aeruginosa*, of whom 38 (5.8%) were colonised or infected with an MDR isolate, giving an incidence of 0.1 patient per 1000 patient-days. The 38 non-duplicate isolates yielded 12 different PFGE patterns, three of which included isolates from four patients and one of which included isolates from 15 patients. Two isolates produced acquired extended-spectrum β -lactamase (one OXA-14 and one OXA-28). Genotyping showed that cross-transmission was responsible for about 70% of MDR *P. aeruginosa* cases although spatio-temporal analysis failed to demonstrate when this might have occurred for most cases. The major epidemic and the three main micro-epidemic clones were already present in our hospital with a more susceptible phenotype. It is likely that some *P. aeruginosa* clones are endemic in our hospital and that, within these clones, MDR isolates emerge under antibiotic pressure. Our results indicate that cross-transmission plays a major role in the spread of MDR *P. aeruginosa* and suggest that priority should be given to the improvement of standard hygienic precautions.

© 2010 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading causes of bacteraemia and pneumonia in patients hospitalised in intensive care units (ICUs).¹ A point prevalence survey conducted in France showed that this organism was responsible for 18% of nosocomial infections in ICUs, and for 6% in medical and surgical departments.² Environmental sources such as contaminated equipment have been identified as potential reservoirs, although the significance of *P. aeruginosa* in the hospital environment remains controversial.³ In addition to being intrinsically resistant to several antimicrobial agents, *P. aeruginosa* can acquire resistance to conventional

antipseudomonal antibiotics including antipseudomonal penicillins, ceftazidime, carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones.⁴ Over recent years, nosocomial infections and outbreaks caused by strains resistant to all clinically available antipseudomonal antibiotics have been reported.^{5–7} Multidrug resistance in *P. aeruginosa* makes treatment of infections difficult and expensive and may increase patient morbidity and mortality.⁴ The objective of this study was to assess the incidence and molecular epidemiology of multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) in our university hospital.

Methods

Setting and study design

Besançon Hospital is a 1200 bed, university-affiliated hospital in eastern France. Data were collected prospectively from October

* Corresponding author. Address: Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, 3 Bd Fleming, 25030 Besançon cedex, France. Tel: +33 3 81668053; fax: +33 3 81668914.

E-mail address: daniel.talon@univ-fcomte.fr (D. Talon).

2007 to September 2008. All clinical and screening isolates of *P. aeruginosa*, excluding isolates from patients with cystic fibrosis, were collected and tested for antimicrobial resistance to 13 antipseudomonal agents (ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, aztreonam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin and colistin). Screening samples (nose, rectum and tracheal aspiration) were collected only in adult ICUs. Resistance patterns were determined by the Kirby–Bauer disc method on Mueller–Hinton agar (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France), as recommended by the Antibio-gram Committee of the French Society for Microbiology.⁸ A Sirscan automated image analyser (IZA, Perols, France) was used to measure inhibition diameters and to compile resistance data.⁹ MDR *P. aeruginosa* (defined as strains resistant or intermediate to all antipseudomonals tested or susceptible to only one antipseudomonal antibiotic with the exception of colistin) were further selected.

Bacterial identification and determination of resistance mechanisms

Diagnostic or screening samples were streaked on Columbia agar supplemented with 5% horse blood or on Mueller–Hinton agar (Bio-Rad), respectively. Identification of *P. aeruginosa* was based on positive oxidase activity, resistance to kanamycin, growth at 41 °C and failure to grow at 4 °C, and additionally confirmed by biochemical testing (ID32GN, bioMérieux, Marcy l’Étoile, France). Screening for extended-spectrum β -lactamase activity was performed for all ceftazidime-resistant isolates using the double disc synergy test (DDST) where discs of ceftazidime, aztreonam and cefepime (30 μ g each) were positioned at variable distance from a disc containing amoxicillin 20 μ g and clavulanate 10 μ g.¹⁰ Whole-cell DNA was extracted and purified with the QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France). Specific primers were used to amplify the β -lactamase-encoding genes *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{BEL}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-1} group, *bla*_{OXA-II} group, *bla*_{OXA-III} group, *bla*_{OXA-9} and *bla*_{OXA-18} by polymerase chain reaction (PCR) from these extracts.¹¹ Positive PCR controls were run in parallel. Purified amplicons were sequenced on both strands on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were compared and aligned with reference sequences using the NCBI BLAST program.

Genotyping

A *Dra*I-macrorestriction profile of total DNA from each isolate was determined by pulsed-field gel electrophoresis (CHEF DRILL, Bio-Rad) according to a method previously developed in our laboratory.¹² We used GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to establish a DNA similarity matrix. A dendrogram was constructed using the unweighted-pair-group method of the arithmetic average clustering method with the Dice coefficient. We ensured that gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 as a reference. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) results were interpreted according to international recommendations.¹³ PFGE patterns were considered as sporadic if recovered from a single patient, micro-epidemic if recovered from two to five patients, and epidemic if recovered from more than five patients.

Results

During the study period, 60,454 patients were admitted for a total of 328,782 patient-days. A total of 654 patients had at least one sample positive for *P. aeruginosa*; strains from 38 of these patients (5.8%) were MDR. Five ICU patients were included as a result of positive screening tests for MDR-PA. Table 1 reports the

Table 1
Incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates according to specialty, Besançon University Hospital

Type of unit	No. of patients with clinical specimens yielding <i>P. aeruginosa</i>	Incidence per 100 patients (95% CI)	Incidence per 1000 patient-days (95% CI)
Surgery	10	0.036 (0.018–0.069)	0.076 (0.039–0.145)
Haematology	3	0.227 (0.058–0.721)	0.233 (0.060–0.741)
Medicine	14	0.057 (0.032–0.098)	0.095 (0.054–0.164)
Paediatrics	0	0	0
ICU	6 (11) ^a	0.705 (0.286–1.608)	0.618 (0.251–1.420)
Total	33 (38) ^a	0.054 (0.038–0.077)	0.100 (0.070–0.143)

ICU, intensive care unit.

^a Numbers in parentheses indicate the total number of isolates including screening isolates. Screening isolates were excluded from the incidence calculations.

incidence of MDR *P. aeruginosa* according to medical specialty, excluding the five screening isolates.

Only two of the 38 patients were positive for MDR-PA within 48 h of admission. The mean period between admission and recognition of MDR-PA colonisation for the 36 remaining patients was 41 days. Thirteen of these 36 patients were initially colonised with MDR-PA; the remaining 23 were initially colonised with a more susceptible isolate.

Among the 38 non-duplicate MDR-PA isolates, six were resistant to all antipseudomonals tested (excluding colistin), 16 were non-susceptible (resistant or intermediate) to all antipseudomonals tested and 10 remained susceptible to one agent (tobramycin, 4; amikacin, 2; gentamicin, 1; aztreonam, 1; imipenem, 1; ciprofloxacin, 1). Two isolates produced extended-spectrum oxacillinase (one OXA-14 and one OXA-28). The remaining 36 isolates were considered to be AmpC overproducers in the absence of *bla* gene identification by PCR and negative DDST tests.

The 38 non-duplicate isolates yielded 12 PFGE patterns (A to L): six unique patterns, one pattern including isolates from two patients, one pattern including isolates from three patients, three patterns including isolates from four patients, and one pattern (clone D) including isolates from 15 patients (Figure 1). Figure 2 shows the spatio-temporal distribution of patients colonised or infected with epidemic clone D. Clone D's pattern and the three patterns including isolates from four patients were included in our *P. aeruginosa* PFGE database: all four patterns were shared by non-MDR isolates genotyped previously. Extended-spectrum oxacillinase OXA-14 was produced by the single representative of sporadic clone H (patient 13) and OXA-28 by one of the two representatives of micro-epidemic clone H (patient 31).

Discussion

The incidence of acquired MDR-PA colonisation/infections (0.1/1000 patient-days) in our hospital is not as high as that observed for other MDR bacteria such as MRSA (0.275/1000 patient-days) and ESBL-producing Enterobacteriaceae (0.263/1000 patient-days) during the same period. The incidence of MDR-PA is not negligible, however, particularly considering our stringent definition of multidrug resistance, and these strains pose a therapeutic challenge. Unfortunately we cannot compare our incidence rate with other people's due to variability in the definition of MDR-PA.¹⁴

The issue of screening for MDR-PA deserves mention. In ICUs where a screening programme has been implemented, five out of 11 patients with MDR-PA were detected only by screening. Although compliance with hand hygiene procedures should be sufficient to prevent cross-transmission, screening appears to be an important measure when a healthcare facility is confronted with outbreaks of MDR-PA.^{12,15,16}

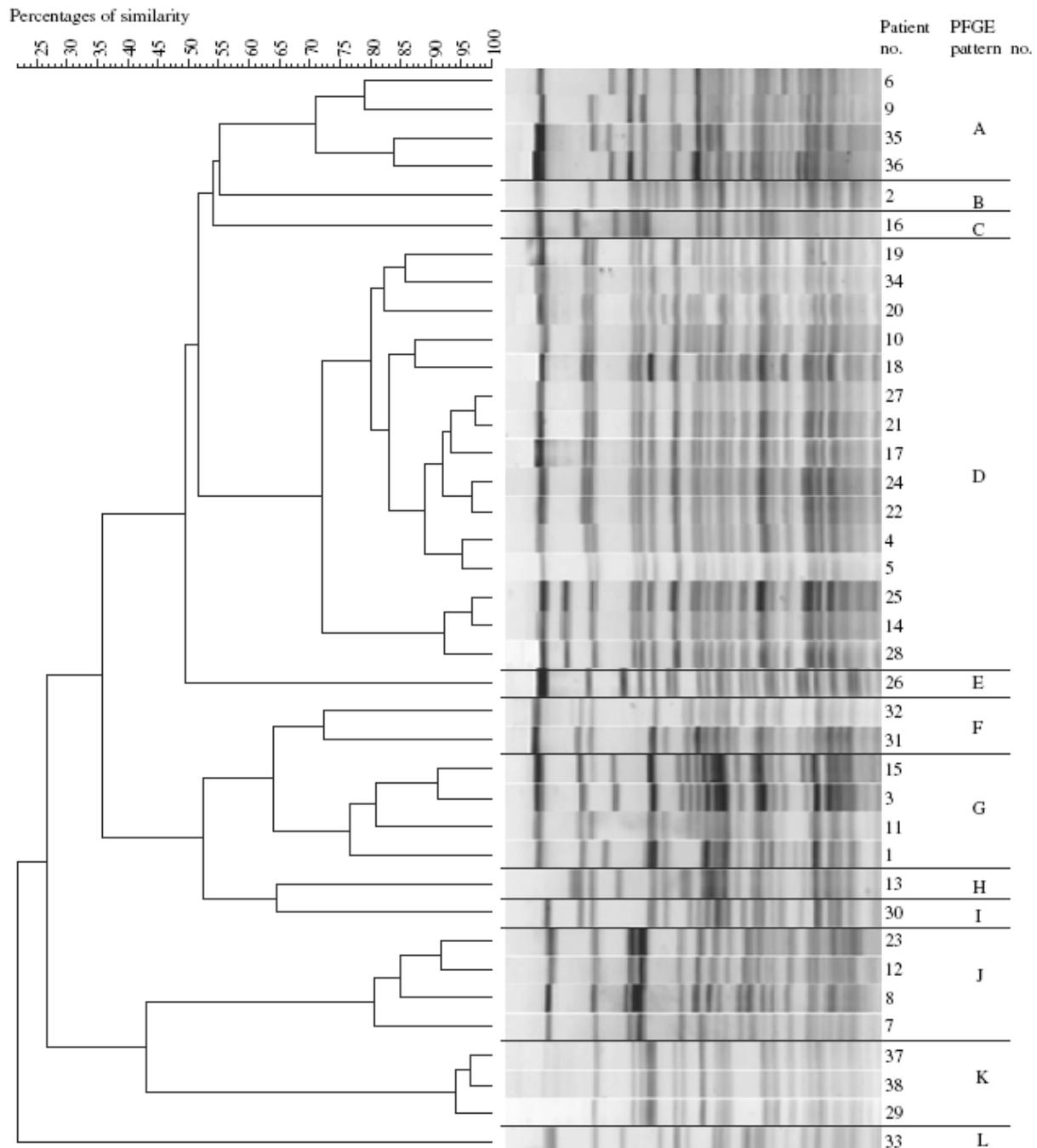


Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis banding patterns after *DraI* digestion of non-duplicate *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Spatio-temporal analysis of the distribution of MDR-PA in our hospital demonstrated that all specialties (ICU, medicine, haematology, surgery), with the exception of paediatrics, are contaminated. Genotyping showed that one major epidemic clone represented 40% of MDR-PA isolates, while micro-epidemic

clones accounted for 30%, suggesting that cross-transmission is responsible for about 70% of MDR-PA cases. Nevertheless, two observations are of interest. First, the major epidemic and the three main micro-epidemic clones were already present with a more susceptible phenotype in our hospital before the study. Second,

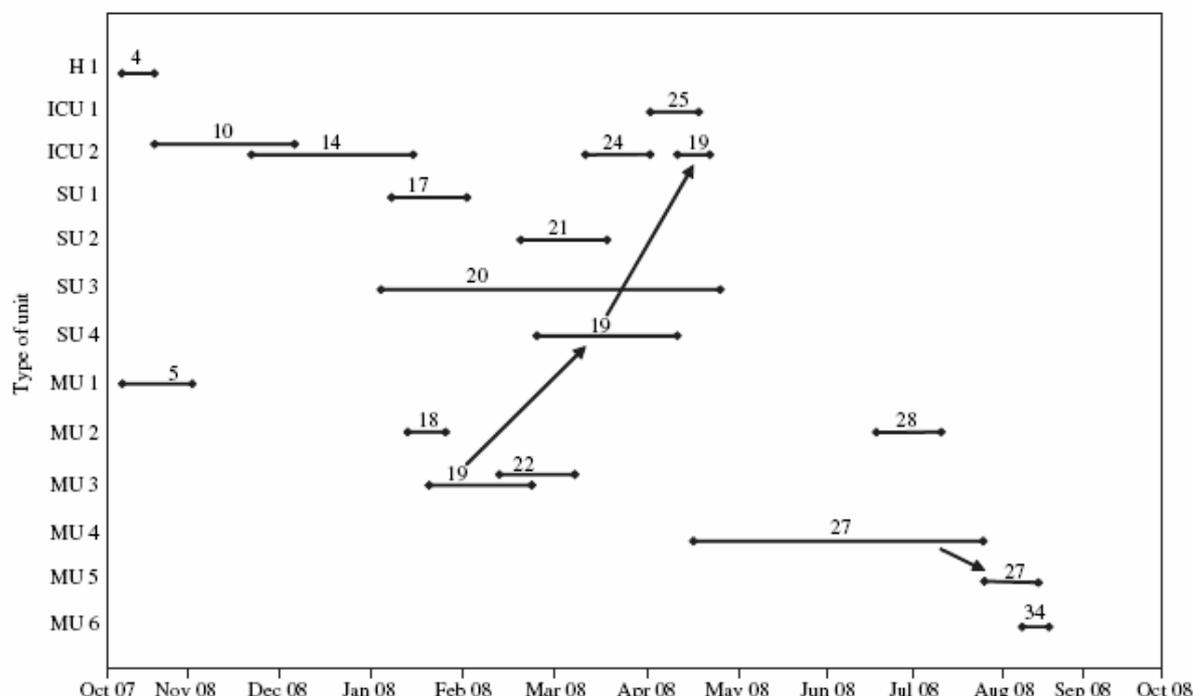


Figure 2. Spatio-temporal distribution of pulsed-field gel electrophoresis pattern D. H, haematology unit; MU, medical unit; SU, surgical unit; ICU, intensive care unit. Numbers indicate the patient number; solid lines indicate the stay of the patient; arrows indicate transfer of the patient between units.

spatio-temporal analysis failed in most cases to demonstrate opportunities for cross-transmission (Figure 2). As MDR-PA was detected in different units over a long period, these strains are probably endemic within our hospital. Our results also show that MDR-PA may sporadically acquire or lose resistance determinants during the course of an outbreak. We believe that endemic clones circulate in our hospital and that MDR isolates emerge under antibiotic pressure.

Given the possible life-threatening consequences of *P. aeruginosa* infection and the continued emergence of MDR strains which hamper effective antimicrobial therapy, we require strategies to reduce the development of antimicrobial resistance. Our results indicate that cross-transmission plays a major role in the spread of MDR-PA in our hospital and suggest that priority should be given to improvement of standard hygiene procedures, particularly hand disinfection before and after contact with patients. Prudent use of antibiotics is also essential.

Conflict of interest

None declared.

Funding sources

This work was funded by grants from the French Ministry of Health in the framework of a clinical research programme 2007.

References

- Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992;29(Suppl. A):19–24.
- Institut national de veille sanitaire. *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006*. Paris: InVS; 2007.

- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;73:338–344.
- Livemore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634–640.
- Deplano A, Denis O, Poirel L, et al. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2005;43:1198–1204.
- Vetoretto L, Floret N, Hocquet D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1217–1222.
- Hsueh PR, Tseng SP, Teng IJ, Ho SW. Pan-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infection at a university hospital in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:670–673.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Rapport 2007*. Paris: Société Française de Microbiologie; 2007.
- Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Siscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2000;38:1688–1693.
- Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2990–2995.
- Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide investigation of extended-spectrum β -lactamases, metallo- β -lactamases and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Antimicrob Agents Chemother* (in press).
- Bertrand X, Thouverez M, Talon D, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001;27:1263–1268.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–2239.
- Falagas ME, Kotsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2006;55:1619–1629.
- Berthelot P, Grattard F, Mahul P, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2001;27:503–512.
- Koss WG, Khalili TM, Lemus JF, Chelly MM, Margulies DR, Shabot MM. Nosocomial pneumonia is not prevented by protective contact isolation in the surgical intensive care unit. *Am Surg* 2001;67:1140–1144.

4. Etude 4 – Epidémie hospitalière de *Pseudomonas aeruginosa* productrice d'une oxacillinase à spectre étendu de type OXA-19.

4.1. Présentation de l'étude

Pseudomonas aeruginosa a la capacité d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques. La production de β -lactamases de classe A ou B (classification d'Ambler) est fréquemment décrite dans la littérature. Par contre, les souches de *P. aeruginosa* produisant des oxacillinases à spectre étendu (de classe D) ont été décrites de façon sporadique et leur épidémiologie reste mal connue.

Cette étude rapporte les résultats de l'analyse d'une épidémie de *P. aeruginosa* produisant une oxacillinase à spectre étendu de type OXA-19 qui est survenue au centre hospitalier universitaire de Nancy. Toutes les souches de *P. aeruginosa* résistant à la ceftazidime (diamètre d'inhibition <15 mm), à l'exclusion des isolats de mucoviscidose, ont été recueillies entre octobre 2007 et septembre 2008.

Les analyses effectuées incluaient la détection phénotypique des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) par le test de synergie, l'identification des gènes *bla* codant pour les BLSE (PCR et séquençage) et le génotypage par l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

4.2. Résultats

Au total, 92 souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime ont été isolées chez 48 patients. Les 92 isolats ont donné 10 pulsotypes (PT) par l'analyse PFGE, 4 PT uniques, 1 PT comprenait les isolats de 2 patients, 2 PT avec les isolats de 3 patients, 1 PT avec les isolats de 5 patients, 1 PT avec les isolats de 14 patients et 1 PT avec les isolats de 23 patients. Parmi les 48 patients, 42 ont été colonisés / infectés par un souche avec un profil électrophorétique unique et les 6 autres ont été colonisés / infectés de façon séquentielle par des souches présentant 2 profils électrophorétiques différents. Une synergie a été observée pour 48 isolats entre la ceftazidime et le clavulanate (la distance des disques de centre à centre était de 12 mm). Pour ces 48 isolats, le point isoélectrique a révélé la présence d'une β -lactamase ($pI=7,6$) et les gènes *aacA4* et *blaOXA-19* ont été identifiés par PCR.

Les 48 isolats producteurs de OXA 19 ont été isolés chez 27 patients et ont été regroupés en 3 pulsotypes, PT n° 2 (3 patients), PT n° 6 (1 patient) et PT n°8 (23 patients). Une unité de soins intensifs a été identifiée comme étant l'épicentre de l'épidémie et la propagation dans les autres unités de soins a été engendrée probablement par les transferts de patients. En outre, compte tenu de la courbe épidémique, il est probable que le gène blaOXA-19 a été transféré du clone 8 au clone 2 puis au clone 6.

4.3. Conclusion

À notre connaissance, c'est le premier rapport décrivant une épidémie impliquant des souches de *P. aeruginosa* produisant une oxacillinase clavulanate-résistante à spectre étendu. L'émergence de ces souches pose un problème de détection. L'utilisation d'un test de dépistages spécifiques est nécessaire pour la surveillance continue de ces micro-organismes, ainsi que la mise en œuvre des mesures de lutte contre l'infection afin de prévenir leur transmission croisée entre patients.

4.4. Texte de l'article

Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading causes of bacteraemia and pneumonia in patients hospitalized in intensive care units (Bertrand *et al.*, 2001). In addition to being intrinsically resistant to several antimicrobial agents, *P. aeruginosa* can acquire resistance to conventional anti-pseudomonal antibiotics including anti-pseudomonal penicillins, ceftazidime, carbapenems, aminoglycosides and ciprofloxacin (Carmeli *et al.*, 1999). The mechanisms of resistance to β -lactams mostly involve stable upregulation of the intrinsic cephalosporinase AmpC, acquisition of transferable β -lactamases (with narrow or extended spectrum), outer-membrane impermeability (alteration or underproduction of porin OprD) or MexAB–OprF efflux pump overproduction (Livermore, 2002). Clinical *P. aeruginosa* isolates producing class A extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) such as TEM, SHV, PER, GES, VEB, BEL and CTX-M are frequently described (Weldhagen *et al.*, 2003). Ambler class B enzymes (metallo- β -lactamases, such as IMP, VIM, SPM and GIM) also spread among clinical *P. aeruginosa* isolates, especially in Asia and Europe (Rossolini *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* strains producing extended-spectrum oxacillinases (from the Ambler class D) have sporadically been described but knowledge of their spread in the clinical setting remains poor (Poirel *et al.*, 2010).

Within the framework of a hospital clinical research project, we found evidence of an outbreak of *P. aeruginosa* producing the extended-spectrum oxacillinase OXA-19. This report describes the microbiological investigation of this outbreak.

In the bacteriology laboratory of Nancy University Hospital (Lorraine, France), the susceptibility of all *P. aeruginosa* isolates to

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the sequence of the class 1 integron is FJ906752.

a panel of anti-pseudomonal agents was systematically determined by the disc diffusion method on Mueller–Hinton agar (bioMérieux) according to the guidelines of the AntibioGram Committee of the French Microbiology Society. All ceftazidime-resistant (Caz^R) (MIC >8 mg l⁻¹) *P. aeruginosa* strains, excluding cystic fibrosis isolates, were collected over 1 year (from October 2007 to September 2008). Overall, 92 Caz^R *P. aeruginosa* isolates were obtained from 48 patients.

An ESBL phenotypic screening test was performed for all Caz^R isolates by using the double disc susceptibility test (DDST), where discs of ceftazidime, aztreonam and cefepime (30 μ g each) were positioned at a variable distance from a disc containing amoxicillin (20 μ g) and clavulanate (10 μ g) (Jiang *et al.*, 2006). A slight synergy was observed for 48 isolates between ceftazidime- and clavulanate-containing discs only when the distance between discs (centre to centre) was 12 mm (data not shown).

For all of these isolates, isoelectric focusing (Hocquet *et al.*, 2003) revealed the presence of the AmpC cephalosporinase (pI 8.1), as well as a secondary β -lactamase exhibiting a pI of 7.6. The identification of the secondary β -lactamase was carried out by PCR on whole-cell DNA using primers specific for the class D β -lactamases (OXA-10, OXA-2 and OXA-1 derivatives) because of the basic pI of this enzyme and the poor synergy provided by clavulanate toward ceftazidime (Bert *et al.*, 2002). Only PCR using primers targeting the *bla*_{OXA-10} group was positive. As *bla*_{OXA} genes are most frequently found in class 1 integrons (Fluit & Schmitz, 2004), we also performed PCR experiments using consensus primers 5'-CS and 3'-CS specific for class 1 integrons (Levesque *et al.*, 1995). The PCR amplicons (1673 bp) were sequenced on both strands, resulting in the identification of a class 1 integron (GenBank accession no. FJ906752) containing two resistance

gene cassettes, namely *aacA4*, which determines an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase conferring high resistance to gentamicin and tobramycin, and *bla*_{OXA-19}, which encodes the extended-spectrum OXA-19 (Mugnier *et al.*, 1998).

PFGE typing was performed on all Caz^R isolates as previously described (Bertrand *et al.*, 2000). We used the GelCompar software (Applied Maths) to establish a DNA similarity matrix. A dendrogram was constructed using the unweighted pair-group method with arithmetic averages clustering method and the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 as a reference. PFGE results were interpreted according to international recommendations (Tenover *et al.*, 1995). PFGE analysis showed that the 92 isolates clustered in 10 different PFGE patterns: two large clusters comprising 23 and 14 isolates, respectively; three smaller clusters comprising three, two and three isolates, respectively; and four unique patterns from four isolates (Fig. 1). A single PFGE pattern was detected in 42 patients, and at least two different PFGE patterns were identified in six patients. The 48 isolates producing OXA-19 recovered from 27 patients were clustered into three PFGE patterns: no. 2 (three patients), no. 6 (one patient) and no. 8 (23 patients). One intensive care unit was the epicentre of the main OXA-19-producing clone (no. 8), which further spread to other units, likely as a consequence of patient transfers. Moreover, considering the epidemic curve, it is likely that the *bla*_{OXA-19} gene was transferred from PFGE pattern 8 to PFGE patterns 2 and 6 (Fig. 2). Among the 27 non-replicate OXA-19-producing isolates (one per patient), 22 were resistant to all anti-pseudomonal antibiotics tested (ticarcillin, piperacillin–tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, tobramycin, amikacin and ciprofloxacin) with the exception of colistin.

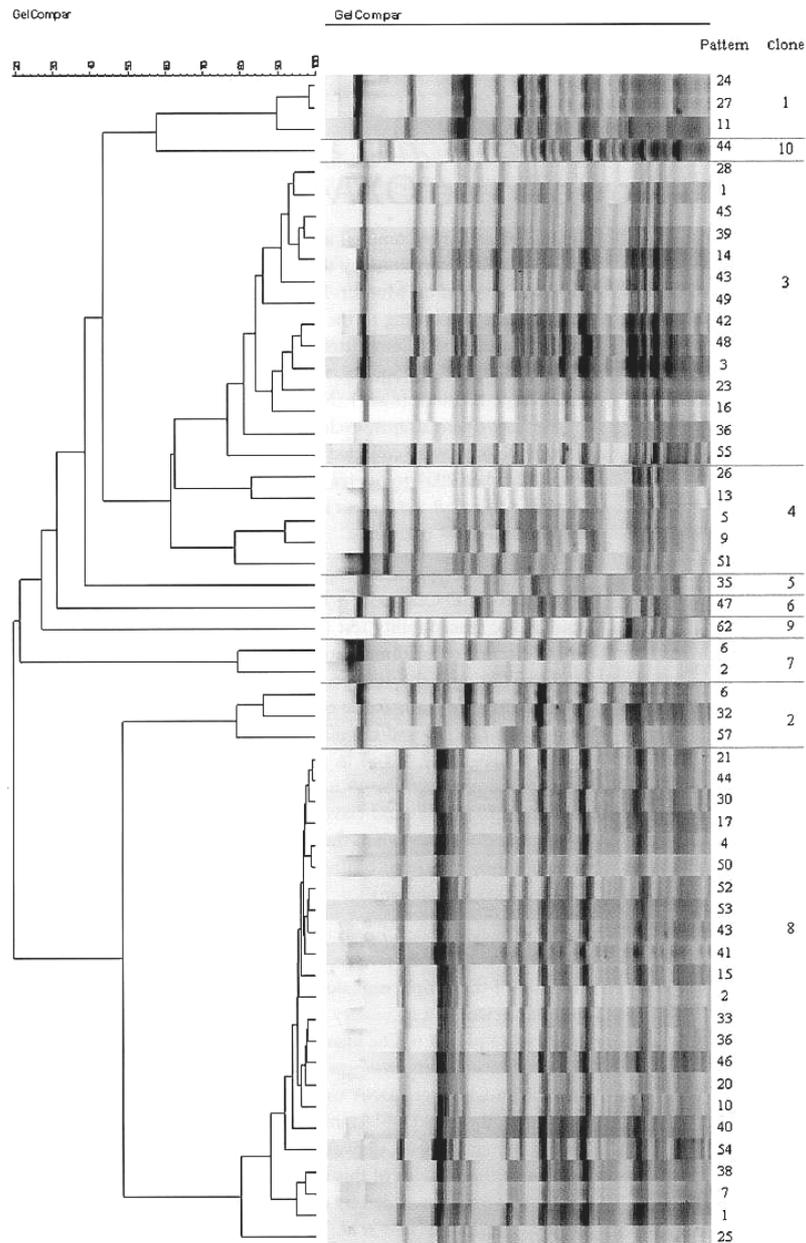


Fig. 1. Pulsed-field electrophoresis banding patterns after *DraI* digestion of non-duplicate *P. aeruginosa* isolates.

To our knowledge, this is the first report describing an outbreak involving *P. aeruginosa* isolates producing a clavulanate-resistant extended-spectrum oxacillinase. During the same period, we also evidenced an outbreak of *P.*

aeruginosa producing OXA-28 in another French hospital (Hocquet *et al.*, 2008). The emergence of *P. aeruginosa* producing such β -lactamases may be related to a recent spread of extended-spectrum oxacillinases among *P. aeruginosa* clinical isolates. This

phenomenon may be underestimated because of the difficulty in detecting such strains in clinical laboratories. Indeed, most of these oxacillinases (with the exception of OXA-18) are poorly inhibited by clavulanate. This undermines DDST

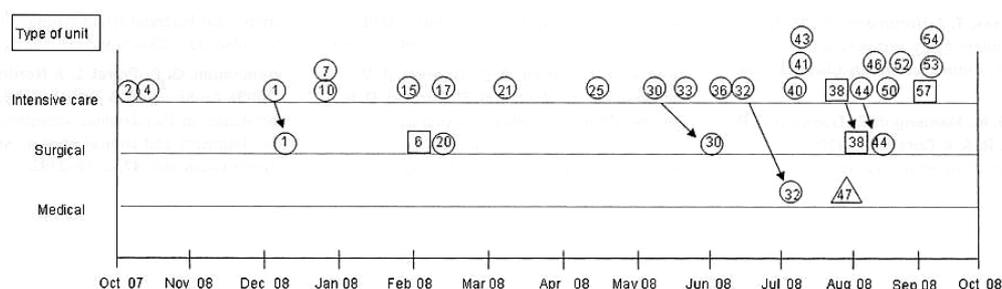


Fig. 2. Spatio-temporal distribution of the PFGE pattern of OXA-19-producing isolates. Numbers indicate patient number according to the date of first isolation; circles represent PFGE pattern 8; squares represent PFGE pattern 2; and the triangle represents PFGE pattern 6. Arrows indicate the transfer of the patient between units.

screening tests using conventional distance (≥ 20 mm) between third-generation cephalosporins and clavulanate. Extended-spectrum oxacillinase activity is also inhibited by cloxacillin, a compound used in phenotypic screening tests to unmask ESBLs in an AmpC overproduction background (Aubert *et al.*, 2004). OXA-19-producing *P. aeruginosa* is detected only when ceftazidime- and clavulanate-containing discs are in close approximation to each other.

In conclusion, the emergence and spread of extended-spectrum oxacillinases among *P. aeruginosa* clinical strains is a matter of concern. These multidrug-resistant bacteria caused infections that are difficult to treat, as colistin often remains the unique therapeutic option. Ongoing surveillance of these micro-organisms, with the use of a specific screening test, is warranted as well as the implementation of infection control measures to prevent their cross-transmission between patients.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the French Ministry of Health in the framework of a clinical research programme 2007.

Pascal Cholley,^{1,2} Didier Hocquet,^{3,4}
Corentine Alauzet,⁵
Aurélien Cravoisy-Popovic,⁶
Daniel Talon,^{1,2,4} Nejla Aissa,⁵
Patrick Plésiat^{3,4}
and Xavier Bertrand^{1,2,4}

¹Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, Besançon, France

²UMR 6249 Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, Besançon, France

³Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, Besançon, France

⁴Centre National de Référence-Résistance chez *P. aeruginosa*, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, Besançon, France

⁵Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Nancy, Nancy, France

⁶Service de Réanimation Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Nancy, Nancy, France

Correspondence: Xavier Bertrand (xavier.bertrand@univ-fcomte.fr)

Aubert, D., Girlich, D., Naas, T., Nagarajan, S. & Nordmann, P. (2004). Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum β -lactamase *bla*_{V_{EB}} gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3284–3290.

Bert, F., Branger, C. & Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* **50**, 11–18.

Bertrand, X., Bailly, P., Blasco, G., Balvay, P., Boillot, A. & Talon, D. (2000). Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. *Clin Infect Dis* **31**, E9–E14.

Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D., Boillot, A., Capellier, G., Floriot, C. & Hellas, J. P. (2001). Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa*

in intensive care units. *Intensive Care Med* **27**, 1263–1268.

Carmeli, Y., Troillet, N., Karchmer, A. W. & Samore, M. H. (1999). Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* **159**, 1127–1132.

Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* **10**, 272–288.

Hocquet, D., Bertrand, X., Kohler, T., Talon, D. & Plesiat, P. (2003). Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1887–1894.

Hocquet, D., Thouverez, M., Legrand, F., Bertrand, X. & Plesiat, P. (2008). Modulation of extended-spectrum beta-lactamase expression in response to antibiotic chemotherapy. In *Abstracts of the 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy/46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America*, Abstract C1-118. Washington DC: American Society for Microbiology, Infectious Diseases Society of America.

Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F. & Lu, Y. (2006). Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2990–2995.

Levesque, C., Piche, L., Larose, C. & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 185–191.

Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **34**, 634–640.

Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A. T. & Collatz, E. (1998). Novel OXA-10-derived extended-spectrum β -lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3113–3116.

Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 24–38.

Rossolini, G. M., Mantengoli, E., Docquier, J. D., Musmanno, R. A. & Coratza, G. (2007). Epidemiology of infections caused by

multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *New Microbiol* 30, 332–339.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis:

criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233–2239.

Weldhagen, G. F., Poirel, L. & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2385–2392.

5. Etude 5 – Détection d’une nouvelle oxacillinase à spectre étendu chez *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1. Présentation de l’étude

Depuis le début des années 1990, les oxacillinases à spectre étendu ont été rapportées chez des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*, principalement en provenance de Turquie et de France, et leur identification est souvent difficile. Le but de cette étude était de décrire l’émergence chez un patient d’une nouvelle oxacillinase à spectre étendu, nommée OXA-147, découlant de OXA-35.

En Janvier 2009, deux souches (4747 et 4759) de *P. aeruginosa* présentant des sensibilités différentes à la ceftazidime (4747 : CMI = 32 mg/L et 4759 : CMI=256 mg/L) ont été isolées à partir d’un prélèvement de pied infecté chez un patient diabétique admis à l’hôpital Jean Minjoz de Besançon (France). A ce moment là, le patient était sous traitement par ceftriaxone et rifampicine pour une endocardite infectieuse due à *Proteus mirabilis*.

Les analyses effectuées incluaient la détection phénotypique des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) par le test de synergie, l’isoélectrofocalisation, l’identification des gènes *bla* codant pour les BLSE (PCR et séquençage) et le génotypage par l’électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

5.2. Résultats

L’analyse par PFGE a montré que les deux souches avaient le même pulsotype. Le test de synergie était positif uniquement pour l’isolat 4747. Pour l’isolat 4759, l’isoélectrofocalisation a permis d’identifier une β -lactamase avec un point isoélectrique estimé à 8,0, ce qui évoquait une β -lactamase de classe D. Une PCR quantitative en temps réel après transcription inverse (RT-qPCR) a confirmé une surexpression du gène *AmpC* dans l’isolat 4759 (81 fois plus élevée que dans l’isolat 4747 ou dans la souche de référence PAO1). L’identification des gènes *bla* par PCR successives s’est avérée être positive pour les deux isolats. Le séquençage de l’amplicon de l’isolat 4759 codait une β -lactamase déjà décrite de type OXA-35. Par contre la souche 4747 codait une variante de OXA-35 différente par une substitution d’un acide aminé unique (W-164-L), nommée OXA-147.

L'OXA-147 a une activité plus faible que les autres oxacillinases à spectre étendu, mais la mutation W-164-L augmente fortement les activités hydrolytiques sur l'aztréonam et les céphalosporines, comme la ceftazidime (CMI 128 fois plus élevée chez *E. coli*) et le céfépime (16 fois), comparativement à OXA-35.

5.3. Conclusion

Cette étude a permis de rapporter une nouvelle variante OXA et montre la nécessité de faire systématiquement pour toutes les souches résistantes à la ceftazidime un rapprochement de disques, car les souches positives devraient être considérées comme potentiellement épidémiques.

5.4. Texte de l'article

Merlino J, ed. *Antimicrobial Susceptibility Testing: Methods and Practices With an Australian Perspective*. Sydney, Australia: Australian Society for Microbiology, 2004; 175–88.

11 Shultz TR, Tapsall JW, White PA. Correlation of in vitro susceptibilities to newer quinolones of naturally occurring quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains with changes in *GyrA* and *ParC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 734–8.

12 *Neisseria* MLST Home Page. <http://pubmlst.org/neisseria/> (30 October 2009, date last accessed).

13 Vernel-Pauillac F, Hogan T, Tapsall JW et al. Quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: rapid genotyping of quinolone resistance-determining regions in *gyrA* and *parC* genes by melting curve analysis predicts susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1264–7.

14 Lindback E, Rahman M, Jalal S et al. Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *APMIS* 2002; **110**: 651–7.

15 Trees DL, Sandul AL, Whittington WL et al. Identification of novel mutation patterns in the *parC* gene of ciprofloxacin-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2103–5.

16 WHO Western Pacific Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region, 2006. *Commun Dis Intell* 2008; **32**: 48–51.

J Antimicrob Chemother 2010

doi:10.1093/jac/dkp438

Advance publication 11 December 2009

Detection of a new extended-spectrum oxacillinase in *Pseudomonas aeruginosa*

Damien Fournier¹, Didier Hocquet¹, Barbara Dehecq¹, Pascal Cholley^{1,2} and Patrick Plésiat^{1*}

¹Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques: Laboratoire associé *Pseudomonas aeruginosa*, Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France; ²Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France

*Corresponding author. Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Jean Minjoz, 25030 Besançon cedex, France. Tel: +33-3-81-66-82-86; Fax: +33-3-81-66-89-14; E-mail: patrick.plesiat@univ-fcomte.fr

Keywords: emergence, resistance, β -lactamases

Sir,

Since the early 1990s, several extended-spectrum oxacillinases (ES-OXA) have been reported in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, mainly from Turkey and France.¹ Most of these enzymes, which inactivate ceftazidime and cefepime, differ from the narrow-spectrum penicillinases OXA-2 (e.g. OXA-15 and -32) and OXA-10 (e.g. OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19 and -28) by one or more amino acid substitutions.² With the notable exception of OXA-18, they are not significantly antagonized in their hydrolytic activities by clavulanic acid, an inhibitor widely used in routine testing to detect extended-spectrum

β -lactamases (ESBLs). As a result, their identification in the medical laboratory is often challenging for clinical microbiologists.¹

In this paper, we describe the emergence in a patient under therapy of a novel ES-OXA, named OXA-147, deriving from OXA-35. In January 2009, two isolates of *P. aeruginosa* (4747 and 4759) exhibiting different susceptibilities to ceftazidime were isolated from the infected foot of a diabetic patient admitted to Hospital Jean Minjoz in Besançon (France). Table 1 shows that while being more resistant to ceftazidime and aztreonam, isolate 4747 was more susceptible than isolate 4759 to ticarcillin \pm clavulanic acid, piperacillin \pm tazobactam, cefotaxime and ceftriaxone. At the time these isolates were recovered, the patient was under treatment with ceftriaxone plus rifampicin for an infectious endocarditis due to *Proteus mirabilis*. A subsequent pulsed-field gel electrophoresis experiment demonstrated that the two strains shared an identical DraI banding pattern and, thus, were closely related (data not shown).

A customized double-disc synergy test (DDST) revealed a barely visible synergy zone between discs of ceftazidime (30 μ g; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and clavulanic acid/amoxicillin (10 μ g/20 μ g; Bio-Rad), set at an edge-to-edge distance of 6 mm, for isolate 4747 but not for isolate 4759. Intriguingly, repeated isoelectrofocusing experiments using nitrocefin as the chromogenic substrate failed to detect a β -lactamase in crude bacterial extracts from isolate 4747. In isolate 4759, the same method identified a secondary β -lactamase with an estimated isoelectric point of 8.0, in addition to significant amounts of intrinsic cephalosporinase AmpC (data not shown). Determination of the transcript levels of *ampC* by quantitative real-time PCR after reverse transcription (RT-qPCR) confirmed overexpression of that gene in isolate 4759 (81-fold higher than in isolate 4747 or in the wild-type reference strain PAO1).

Since the above results evoked the occurrence of class D β -lactamases in isolates 4759 (elevated pI) and 4747 (low inhibition by clavulanic acid), PCR experiments were undertaken with consensus primers specific to *bla*_{OXA} genes.³ PCRs targeting the *bla*_{OXA-10} group turned out to be positive for isolate 4759 as well as for isolate 4747. As most of the oxacillinase genes are located on class 1 integrons,² we also performed PCR experiments using consensus primers annealing to the 5'-CS and 3'-CS regions of these elements.⁴ Two amplicons of identical length were obtained from the strains. Sequence analysis of these DNA fragments (2162 bp) revealed the presence of two open reading frames (ORFs). The first one (555 bp), located immediately downstream of the class 1 integrase gene *intI1*, encodes aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Ib, an enzyme conferring resistance to amikacin and tobramycin. The second ORF (801 bp) was found in strain 4759 to code for the already described narrow-spectrum β -lactamase OXA-35 and in strain 4747 to code for a variant differing from OXA-35 by a single amino acid substitution (W164L according to the class D β -lactamases numbering system).^{1,5} As expected, the gene coding for this new OXA derivative (named OXA-147) as well as the *bla*_{OXA-35} and *aac*(6')-Ib genes were borne by typical integron cassettes (core site and inverse core site at each extremity).

The *bla*_{OXA-35} and *bla*_{OXA-147} genes were cloned on vector pPCR Script Cam (Stratagene, La Jolla, CA, USA) previously cleaved with enzyme SrfI to yield recombinant plasmids pOXA-35 and pOXA-147, respectively. Transformants of

Table 1. Resistance levels conferred by β -lactamases OXA-35 and OXA-147 in *P. aeruginosa* and *E. coli*

β -Lactam ^a	MIC (mg/L)					
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> 4759 ^b	<i>P. aeruginosa</i> 4747	<i>E. coli</i> XL1 (pOXA-35)	<i>E. coli</i> XL1 (pOXA-147)	<i>E. coli</i> XL1
Amoxicillin	>1024	>1024	>1024	512	32	8
Ticarcillin	16	>512	256	128	64	4
Ticarcillin+CLA	16	>512	128	16	32	4
Piperacillin	4	>64	32	16	8	1
Piperacillin+TZB	4	>64	32	8	8	1
Cefalotin	>1024	>1024	>1024	8	64	8
Cefoxitin	>1024	>1024	>1024	4	32	4
Ceftazidime	2	32	256	0.25	32	0.25
Ceftazidime+CLA	2	32	256	0.25	16	0.25
Cefotaxime	16	>256	128	0.25	1	0.06
Ceftriaxone	64	>512	256	2	4	0.06
Cefepime	2	64	64	0.06	1	0.06
Aztreonam	4	32	64	0.125	4	0.125
Imipenem	2	2	1	0.25	0.5	0.25
Meropenem	1	2	1	<0.03	0.06	<0.03

CLA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^aClavulanic acid at a fixed concentration of 2 mg/L; tazobactam at a fixed concentration of 4 mg/L.

^bAmpC activity was 81-fold higher than that of wild-type strain PAO1 and 4747.

Escherichia coli XL1 Blue® cells (Stratagene) were selected on Mueller–Hinton agar plates supplemented with chloramphenicol (30 mg/L) and ticarcillin (32 mg/L). The MICs of selected β -lactams were determined for the two isolates of *P. aeruginosa* and the recombinant *E. coli* strains (Table 1). Like many of the ES-OXA described so far, OXA-147 has a weaker activity than parental narrow-spectrum oxacillinases on amino-, ureido- and carboxypenicillins.¹ However, the W164L mutation in OXA-147 strongly enhances the hydrolytic activities on aztreonam and cephalosporins, such as ceftazidime (MIC 128-fold higher in *E. coli*) and cefepime (16-fold), compared with OXA-35.

In addition to reporting on a new OXA variant, the present paper illustrates the difficulty in identifying ES-OXA in *P. aeruginosa*. Standard DDST lacks sensitivity in routine, because of the low inhibitory activity of clavulanic acid on these enzymes. The poor hydrolytic activity of some of these ESBLs towards the chromogenic substrate nitrocefin adds further confusion. In the present case, our attention was drawn by the difference in ceftazidime susceptibility between isolate 4749, an AmpC-overproducing mutant likely selected by prolonged therapy with ceftriaxone and which produced penicillinase OXA-35, and isolate 4747, which carries ESBL OXA-147. To improve the detection of ES-OXA in *P. aeruginosa* in routine, we recommend microbiologists to systematically screen all the ceftazidime-resistant strains with a customized DDST. Strains positive with this test should be considered as potentially epidemic and sent to a reference centre for further analysis.

Nucleotide sequence accession numbers

The GenBank accession numbers of class 1 integron gene sequences of strains 4759 and 4747 are FJ957893 and

FJ848783, respectively. The name OXA-147 has received approval from the Jacoby nomenclature clearinghouse (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Funding

This work was supported by the French Ministry of Health (Institut de Veille Sanitaire).

Transparency declarations

None to declare.

References

- Danel F, Page MG, Livermore DM. Class D β -lactamases. In: Bonomo RA, Talmasky M, eds. *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics*. Washington, DC: ASM Press, 2007; 163–94.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Class D β -lactamases: diversity, epidemiology and genetics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; doi: 10.1128/AAC.01512-08.
- Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 11–8.
- Levesque C, Piche L, Larose *et al.* PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 185–91.
- Aubert D, Poirel L, Ali AB *et al.* OXA-35 is an OXA-10-related β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 717–21.

6. Etude 6 – La majorité des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des hôpitaux de l'Est de la France appartiennent à quelques clones.

6.1. Présentation de l'étude

Plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été mises au point, afin de déterminer le lien de parenté entre les différentes souches responsables d'infections nosocomiales et parmi celles-ci l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est reconnue comme la méthode la plus discriminante. Mais en raison de la dynamique du génome chez cette espèce (grande fréquence des événements génétiques), l'équipe de Curran a proposé à des fins de macro-épidémiologie une nouvelle technique de typage génomique par multilocus (MLST).

L'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité génétique, par PFGE et MLST sur un large panel de souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* dans l'Est de la France.

Cette étude a été menée dans les cinq hôpitaux universitaires (Besançon, Dijon, Nancy, Reims, Strasbourg) des cinq régions administratives de l'Est de la France sur une période de trente-deux mois (octobre 2007 à mai 2010). Les souches bactériennes provenaient de prélèvements à visée diagnostique et/ou épidémiologique (dépistage), (mucoviscidose exclue). Les tests de sensibilité ont été effectués dans chaque laboratoire selon leurs méthodes de routine. Tous les isolats indépendants (le premier isolat de chaque patient) dont le phénotype était résistant ou intermédiaire à tous les antibiotiques testés, ou encore sensibles à un seul antibiotique autre que la colistine, ont été envoyés au CHU de Besançon (centre investigateur du projet) pour analyses complémentaires. Sur chaque souche les profils de résistances ont été vérifiés et les analyses suivantes effectuées : 1) détection phénotypique des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) par le test de synergie et 2) identification des gènes *bla* codant pour les BLSE (PCR et séquençage). Le typage moléculaire a combiné deux techniques de génotypage : l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le multi locus sequence typing (MLST).

6.2. Résultats

Au cours de la période d'étude, 187 patients différents ont été colonisés ou infectés par une souche multi-résistante de *P. aeruginosa*. L'analyse PFGE a donné 51 pulsotypes (PT) : 24 PT unique (1 seul patient, 12,8% des patients), 19 PT micro-épidémiques (de 2 à 4 patients pour un total de 46 patients, 24,6% des patients) et 8 PT épidémiques (de 7 à 26 patients pour un total de 110 patients, 58,8% des patients). Sur les 51 clones, 7 clones étaient présents dans plusieurs hôpitaux (5 dans 2 hôpitaux, 1 dans 3 et 1 dans 4). Quatre et 26 isolats étaient producteurs d'une oxacillinase à spectre étendu, respectivement, OXA-28 et OXA-19. Un seul isolat (PT-16) était producteur d'une PER-1. Le typage MLST de 51 souches représentantes des 51 PT a permis d'identifier 24 ST dont les plus fréquentes étaient : ST235, ST111, ST175 et ST395 correspondant respectivement à 11, 8, 6 et 5 PT, et correspondant à 42, 20, 56, et 8 isolats. ST235 était présent dans les cinq hôpitaux participants. Les quatre isolats OXA-28 ont été retrouvés dans le même hôpital et regroupés dans le même PT (PT12), qui était de ST235 de même que l'isolat PER-1. De même, les 26 isolats OXA-19 ont été réunis dans le même PT (PT18) avec la même ST (ST348).

6.3. Conclusion

Nos résultats montrent que la majorité des isolats multi-résistants appartiennent à quelques clones épidémiques présents dans plusieurs régions. De plus, plus de 60% des souches présentaient une ST à distribution internationale (notamment ST111, ST175 et ST235). La multirésistance, indépendamment du mécanisme, est largement supportée par des clones épidémiques au sein de quelques groupes phylogénétiques à répartition géographique large. Nous avons montré que ces clones épidémiques peuvent devenir MDR après mutations chromosomiques sans transfert d'ADN étranger. En outre, l'échange de données standardisées entre les laboratoires et la création de bases de données internationales de référence pour les différents micro-organismes devrait être encouragé, afin de permettre un contrôle efficace de l'évolution des populations microbiennes. Nos résultats indiquent que la transmission croisée joue un rôle majeur dans la propagation des souches MDR-PA à l'hôpital et suggère que la priorité doit être donnée à l'amélioration des procédures d'hygiène standard. L'utilisation rationnelle des antibiotiques est également essentielle.

6.4. Texte de l'article

The majority of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belongs to a few clonal types

Pascal Cholley^{1,2}, Michelle Thouverez^{1,2}, Didier Hocquet^{3,4}, Nathalie van der mee-Marquet⁵, Daniel Talon^{1,2,3}, Xavier Bertrand^{1,2,3}

¹Service d'Hygiène Hospitalière Centre Hospitalier Universitaire Besançon, ²UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche-Comté, ³Centre National de Référence-Résistance chez *P. aeruginosa*, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, ⁴Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, ⁵ Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, France

Corresponding author:

Xavier Bertrand, Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon.
3 Bd Fleming, 25030 Besançon, Cedex, France.

Tel: (33) 3 81669053.

Fax: (33) 3 81668914.

E-mail: xavier.bertrand@univ-fcomte.fr

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, genotyping, multi-drug resistant, epidemiology, MLST, PFGE

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is the third most important nosocomial pathogen in French hospitals, responsible for 10 % of hospital-acquired infections (1). Additionally, the growing threat of antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* is driven by its extraordinary capacity for developing resistance to almost any antibiotic by selection of mutations in chromosomal genes in conjunction with spread of horizontally acquired resistance (2, 3). Multi-drug resistance in *P. aeruginosa* makes treatment of infections both difficult and expensive and can increase morbidity and mortality (4).

There appears to be a consensus that the *P. aeruginosa* population structure is nonclonal epidemic, that clinical isolates are indistinguishable from environmental isolates, and that there are no specific clones with a specific habitat or disease (5). However, some important controversial issues remain. First, since the 1980s, several studies have reported the emergence, spread and persistence of multidrug resistant clones in hospitals evidencing a lack of genetic diversity (5). Second, cystic fibrosis (CF) clones have been reported worldwide, suggestive of an emergence of specific clones spreading within the CF population (5, 6).

The objective of this study was to assess the genetic diversity, using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) of a large panel of multi-drug resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) from patients hospitalized in different French hospitals.

Material and methods

Setting

The five university hospitals (Besançon, Dijon, Nancy, Reims, and Strasbourg) of five administrative regions in eastern France took part in this survey over a 32-month period (from October 2007 to May 2010). These regions account for 8.5 millions of inhabitants corresponding to 14% of the French population.

Bacterial strains

All *P. aeruginosa* clinical and screening (if performed) isolates, except CF isolates, were collected and tested for antimicrobial resistance.

The susceptibility to ticarcillin, tazobactam/piperacillin, ceftazidime, cefepim, aztreonam, meropenem, imipenem, tobramycin, amikacin, gentamicin and ciprofloxacin was assessed in each laboratory according to their routine testing methods.

All non-duplicate isolates (the first isolate of each patient) showing a multi-drug resistant pattern (*i.e.* susceptible to ≤ 1 tested antibiotic, according to 2007 CA-SFM breakpoints (ref 7)) were sent to the central laboratory, where bacterial identification and resistance profile were confirmed. The susceptibility to antibiotics was determined by the Kirby-Bauer disk method on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France), as recommended by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (7). A Sirscan automated image analyzer (I2A, Perols, France) was used to precisely measure inhibition diameters and to compile resistance data (8).

Genotyping

PFGE. The macrorestriction (using *DraI*) profile of total DNA from each isolate was determined by PFGE(CHEF DRIII, Bio-Rad), according to a method previously developed in our laboratory (9). We used the GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to establish a DNA similarity matrix. A dendrogram was constructed using the unweighted-pair-group method of the arithmetic average clustering method with the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 as a reference. PFGE results were interpreted according to international recommendations (10).

MLST. MLST was performed according to the protocol by Curran *et al.* (11), modified by van Mansfeld *et al.* (6). Nucleotide sequences were determined for internal fragments of the *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE* genes on both strands and compared to the *P. aeruginosa* MLST website (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) for assignment of allelic numbers and sequence type (ST). The mega algorithm (<http://www.megasoftware.net>) was used to study the genetic diversity of the different populations of *P. aeruginosa* strains.

Determination of enzymatic resistance mechanisms to β -lactams.

A PCR-based approach has been used in all the isolates to identify the genes encoding β -lactamases with an extended spectrum (Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs; extended-spectrum oxacillinases, ES-OXAs; metallo- β -lactamases, MBLs).

Whole-cell DNA suitable for PCR experiments was extracted and purified with the QiAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France). Specific primers were used to PCR amplify the β -lactamase-encoding genes *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{BEL}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-I group}, *bla*_{OXA-II group}, *bla*_{OXA-III group}, *bla*_{OXA-9} and *bla*_{OXA-18} from the DNA (13). Positive PCR controls with appropriate strains were systematically run in parallel. Purified amplicons were sequenced on both strands using the dye-terminator chemistry on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The nucleotide sequences were compared and aligned with reference sequences using NCBI BLAST program.

Results

During the study period, 187 non-duplicate patients were colonized or infected with a MDR-PA isolate (82 at Besançon, 56 at Nancy, 26 at Strasbourg, 17 at Dijon and 6 at Reims). Ninety-one (48.7%) of these patients were hospitalized in ICUs, whereas the others were distributed in medical units (n=44, 23.5%), surgical units (n=32, 17.1%), hematology units (n=16, 8.6%) and chronic or long-term care units (n=20, 10.7%). Among the 187 non-duplicate MDR-PA isolates, 135 were non susceptible to all the tested antibiotics. Fifty-two remained susceptible to one anti-pseudomonal agent (tobramycin, n=11; amikacin, n=6; gentamicin, n=13; aztreonam, n=5; imipenem, n=2; meropenem, n=4; piperacillin, n=5; ceftazidime, n=2 and ciprofloxacin n=4).

The 187 non-duplicate isolates yielded 51 unique PFGE patterns (designated pattern type, PT1 to PT51) (Figure 1) : 24 unique PTs, 14 PTs including isolates from 2 patients, 2 PTs including isolates from 3 patients, 3 PTs including isolates from 4 patients, 2 PTs including isolates from 7 patients, 1 PT (PT24) including isolates from 9 patients, 1 PT (PT45) including isolates from 13 patients, 1 PT (PT15) including isolates from 16 patients, 1 PT (PT44) including isolates from 17 patients, 1 PT (PT46) including isolates from 22 patients and 1 PT (PT18) including isolates from 26 patients. Most of the PTs were recovered from a single hospital (44/51), whereas 5 were recovered in two hospitals, 1 in 3 and 1 in 4 (Table 1). Considering that PFGE typing is more discriminatory than MLST, we assumed that all the isolates with given PT shared the same ST.

Consequently, MLST was performed on 1 randomly selected isolate of each PT. The 51 PTs clustered into 24 STs (Table 1). Of these, 2 STs were not previously submitted to the *P. aeruginosa* MLST database (ST1004 and ST1005). ST235, ST111, ST175 and ST395 were the most frequent, being detected in 11, 8, 6 and 5 PTs, respectively and by deduction in 42, 20, 56, and 8 isolates. ST348 was found in 2 PTs and the remaining 20 STs were found only once (Table 1). ST235 was present in the five participating hospitals whereas ST111 and ST175 were recovered in four hospitals.

Finally, the 24 STs could be clustered by analysis with the eBURST program into 23 different clonal complexes (CCs; ST308 and ST1004 belonging to CC308). One isolate from PT16-ST235 produced PER-1. Four and 26 isolates produced one acquired ES-OXA, OXA-28 and OXA-19, respectively. The remaining 156 isolates were considered as AmpC overproducers. The four OXA-28-positive isolates were recovered in the same hospital and clustered in the same PT (PT12, ST235) which was shared by 42 isolates. Similarly, the 26 OXA-19-producing isolates were gathered in the same PT (PT18, ST348), shared by 27 isolates.

Discussion

Several molecular typing schemes have been proposed for *P. aeruginosa* to determine the relatedness of nosocomial pathogens. PFGE, which is recognized as the most discriminatory method for molecular typing and has been a clinically valuable tool for evaluating short time epidemiological *P. aeruginosa* infections (14). Due to the dynamic genome of *P. aeruginosa*, there has been a debate regarding the usefulness of PFGE for evaluating long-term global epidemiology of these bacteria. The observed extensive genomic and phenotypic diversity between *P. aeruginosa* strains may originate from the frequent recombination and transfer of mobile genetic elements in this species. Consequently, there is a need for other less ambiguous methods, such as MLST, that is more appropriate to explore long-term evolutionary relationships in *P. aeruginosa* populations (11). Besides, MLST is now documented as the current standard for investigating the population structure of bacterial species (15).

The present study was aimed at determining whether particular epidemic clones were associated with multi-drug resistance among hospital *P. aeruginosa* isolates. We used a two-step typing scheme, PFGE typing on all isolates and MLST on 1 randomly selected isolate of each pulsotype.

In contrast with other recent studies focusing mostly on particular resistance mechanisms (*i.e.* ESBLs or MBLs)(16-21), we attempted to determine the genetic diversity of all MDR-PA isolates recovered during a long period (32 months) on a large population (all the university hospitals of the Northeast part of France).

Our results show that the majority of multidrug-resistant isolates belong to a few clonal types: ST235, ST111 and ST175. ST235 was the founder ST of the clonal complex CC235 (previously described as CC11/BG11). CC235 is internationally distributed and has already been attributed to various ESBL- (such as PER-1, GES-1, BEL-1) as well as MBL- (such as VIM-1, VIM-4, IMP-1) producing clones responsible for outbreaks throughout Europe, Asia and South-America (16, 18-23) (Figure 2).

Interestingly, of the 42 ST235 isolates of our series, one produced the ESBL PER-1, four produced the ES-OXA OXA-28 and none produced MBL (24). The CC235 has been disseminating worldwide over a long period of time, acquiring various resistance genes in particular locales. ST111 has been also, to a lesser extent, reported as an MBL-producing epidemic lineage (25), as well as ST175 (26) (Figure 2). The ST348-epidemic clone producing the ES-OXA OXA-19 reported here, has also been described elsewhere (27).

It is noteworthy that all these international clones (ST235, ST111, ST175) as well as ST227 (the colistin-only-susceptible Brazilian clone (28)), gathering most of the MDR-PA strains, were not recovered in large CF *P. aeruginosa* strains collections (6, 29). Well-characterized CF epidemic strains (*e.g.* Liverpool-ST146 or Dutch-ST406) are also absent from the collections of non-CF MDR *P. aeruginosa* (6, 29).

As genetic capitalism predicts (30), the most successful clones are also more likely to acquire MDR determinants. Subsequently, they are selected more easily under antibiotic pressure, allowing their spread in hospitals. Indeed, this study and recent reports demonstrates the presence of widespread MDR-PA clones in hospitals. These clones are responsible for an important proportion (more than 50% in our survey) of multidrug-resistance within the specie. Taking resistance to β -lactams as an example, these MDR clones were repeatedly reported to carry extended-spectrum β -lactamase-encoding genes located in diverse horizontally acquired elements (integrons, transposons and plasmids) (16-20, 22, 25, 26).

The present study is the first, to our knowledge, evidencing that these successful MDR clones can become resistant to β -lactams after chromosomal mutations and does not necessarily require the transfer of foreign DNA. Some limitations of our study should be addressed. First, the MDR isolates were not equally distributed into the five participating centers, this is due to local differences in resistance level, as previously observed in French hospitals (13). Secondly, we did not type wild-type or non MDR-PA isolates to determine the distribution of the epidemic clones within these populations. However, a nationwide study in the Czech republic demonstrates a non-random distribution of genomic types between susceptible and MDR isolates of *P. aeruginosa*, with the most of the latter associated with three clonal lineages (ST235, ST175 and ST132) (31).

In conclusion and despite its limitations, our study demonstrates a non-random distribution of genomic types among MDR-PA isolates. These findings are in accordance with all published study on this topic, they should be considered with caution as MLST database may be not representative of the whole *P. aeruginosa* population. Moreover, we showed that these epidemic clones can step up to MDR after chromosomal mutations without transfer of foreign DNA, although previous study reported their association with ESBLs, or MBLs. Understanding a species population structure and evolutionary paths is necessary to decide control strategies. Given the possible life-threatening consequences of *P. aeruginosa* infection and the continued emergence of MDR strains which hamper effective antimicrobial therapy, it is clear that strategies to reduce the likelihood of antimicrobial resistance become a key issue. Our results indicate that cross-transmission plays a major role in the hospital spread of MDR-PA and suggests that priority have to be given to improvement of standard hygiene procedures. Wise use of antibiotics is also essential.

Acknowledgements: We are grateful to the following biologists for their participation in this survey:

Conflict of interest: None to declare

Funding sources: This work was funded by grants from the French Ministry of Health in the framework of a clinical research program 2007.

References

1. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006. Résultats préliminaires au 12/01/2007. Institut de veille sanitaire (InVS); 2007.
2. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plesiat P, Talon D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Jun 7.
3. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002 Mar 1;34(5):634-40.
4. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):338-44.
5. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One*. 2009;4(11):e7740.
6. van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, van Berkhout FT, Wolfs T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):4096-101.
7. CA-SFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2007.
8. Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1688-93.
9. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med*. 2001 Aug;27(8):1263-8.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233-9.
11. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5644-9.
12. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):2990-5.
13. Hocquet D, Plesiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3512-5.

14. Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2007 Nov;45(11):3707-12.
15. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561-88.
16. Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2829-34.
17. Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4309-15.
18. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):346-52.
19. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother. 2010 May;65(5):866-71.
20. Juan C, Zamorano L, Mena A, Alberti S, Perez JL, Oliver A. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. J Antimicrob Chemother. 2010 Mar;65(3):474-8.
21. Koh TH, Khoo CT, Tan TT, Arshad MA, Ang LP, Lau LJ, et al. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel bla(IMP-26) gene. J Clin Microbiol. 2010 Jul;48(7):2563-4.
22. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Dec;54(3):330-8.
23. Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. J Antimicrob Chemother. 2009 Jul;64(1):46-51.
24. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Feb;45(2):447-53.

25. Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L, Riccio ML, Dubois V, Tonin EA, et al. Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;14(1):88-90.
26. Elias J, Schoen C, Heinze G, Valenza G, Gerharz E, Riedmiller H, et al. Nosocomial Outbreak of VIM-2 Metallo-Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Associated With Retrograde Urography. Clin Microbiol Infect. 2009 Dec 23.
27. Cholley P, Hocquet D, Alauzet C, Cravoisy-Popovic A, Talon D, Aissa N, et al. Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. J Med Microbiol. 2010 Jul;59(Pt 7):866-9.
28. Fonseca EL, Freitas Fdos S, Vicente AC. The colistin-only-sensitive Brazilian *Pseudomonas aeruginosa* clone SP (sequence type 277) is spread worldwide. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jun;54(6):2743.
29. Waine DJ, Honeybourne D, Smith EG, Whitehouse JL, Dowson CG. Cross-sectional and longitudinal multilocus sequence typing of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum samples. J Clin Microbiol. 2009 Nov;47(11):3444-8.
30. Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol. 2004 Jun;2(6):510-8.
31. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. Res Microbiol. 2010 Apr;161(3):234-42.

Table 1: MLST types compared to PFGE types of 187 *P. aeruginosa* isolates, Eastern France.

MLST no	Allelic profile	Number of isolates	Location* (Nb of isolates)	Year of isolation	PFGE types
ST17	11-5-1-7-9-4-7	1	D (1)	2007	PT48
ST111	17-5-5-4-4-4-3	20	B (12), D (1), N (5), S (1)	2007-2008-2009	PT7-8, PT23-24, PT32-33, PT37-38
ST167	40-5-11-5-4-15-37	2	R (2)	2007	PT13
ST170	36-5-29-7-4-10-7	2	S (2)	2007-2008	PT31
ST175	28-22-5-3-3-14-19	56	B (31), D (9), N (13), S (3)	2007-2008-2009	PT22, PT34, PT44-47
ST179	36-27-28-3-4-13-7	1	D (1)	2007	PT36
ST200	118-144-85-100-60-54-123	2	S (2)	2007	PT3
ST233	16-5-30-11-4-31-41	7	B (7)	2008	PT5
ST235	13-11-3-13-1-2-4	42	B (15), D (4), N (4), R (4), S (15)	2007-2008-2009	PT10-12, PT14-17, PT19-21, PT26
ST242	28-5-5-11-3-15-44	1	S (1)	2008	PT29
ST253	4-4-16-12-1-6-3	1	B (1)	2009	PT9
ST260	14-5-10-7-4-13-7	1	S (1)	2007	PT51
ST274	23-5-11-7-1-12-7	1	S (1)	2008	PT6
ST299	17-11-36-3-3-7-3	2	D (2)	2007	PT30
ST308	13-4-5-5-12-7-15	2	B (2)	2008-2009	PT1
ST313	47-8-7-6-8-11-40	1	B (1)	2008	PT4
ST348	22-20-11-3-2-4-3	27	N (27)	2007-2008	PT18, PT50
ST395	6-5-1-1-1-12-1	8	B (7), S (1)	2007-2008-2009	PT39-43
ST446	18-4-5-3-1-17-13	1	B (1)	2008	PT49
ST453	16-5-11-7-1-7-61	1	N (1)	2008	PT27
ST508	15-5-11-3-2-4-3	1	B (1)	2007	PT25
ST895	11-5-5-11-3-4-7	2	S (2)	2008	PT35
ST1004	22-4-5-5-12-7-15	2	N (2)	2007-2008	PT2
ST1005	15-5-7-46-4-4-1	3	B (3)	2008-2009	PT28

* B: Besançon university hospital, D: Dijon university hospital, N: Nancy university hospital, S: Strasbourg university hospital, R: Reims university hospital

Figure 1: Pulsed-field electrophoresis banding patterns after *DraI* digestion of non-duplicate *P. aeruginosa* isolates.

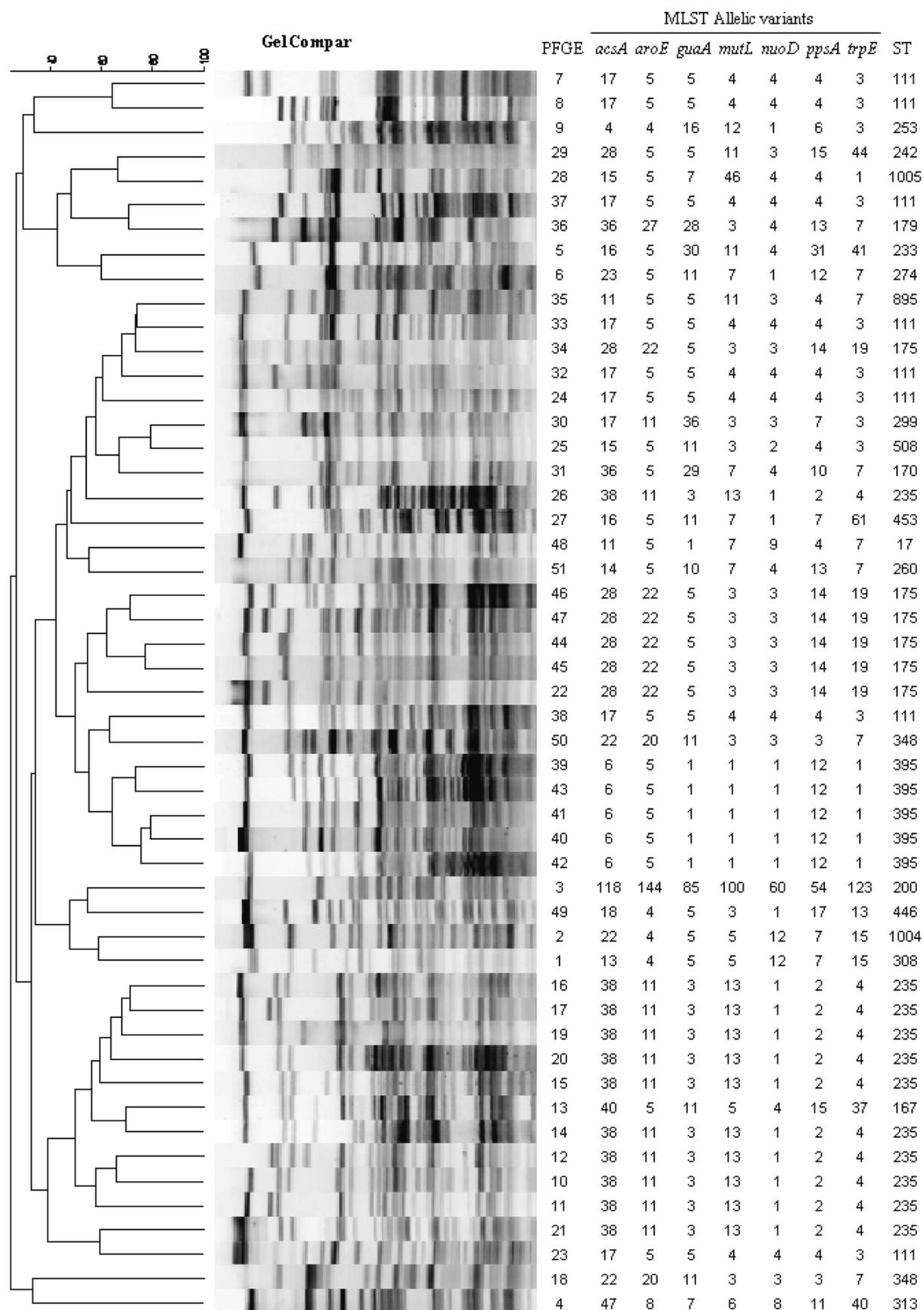
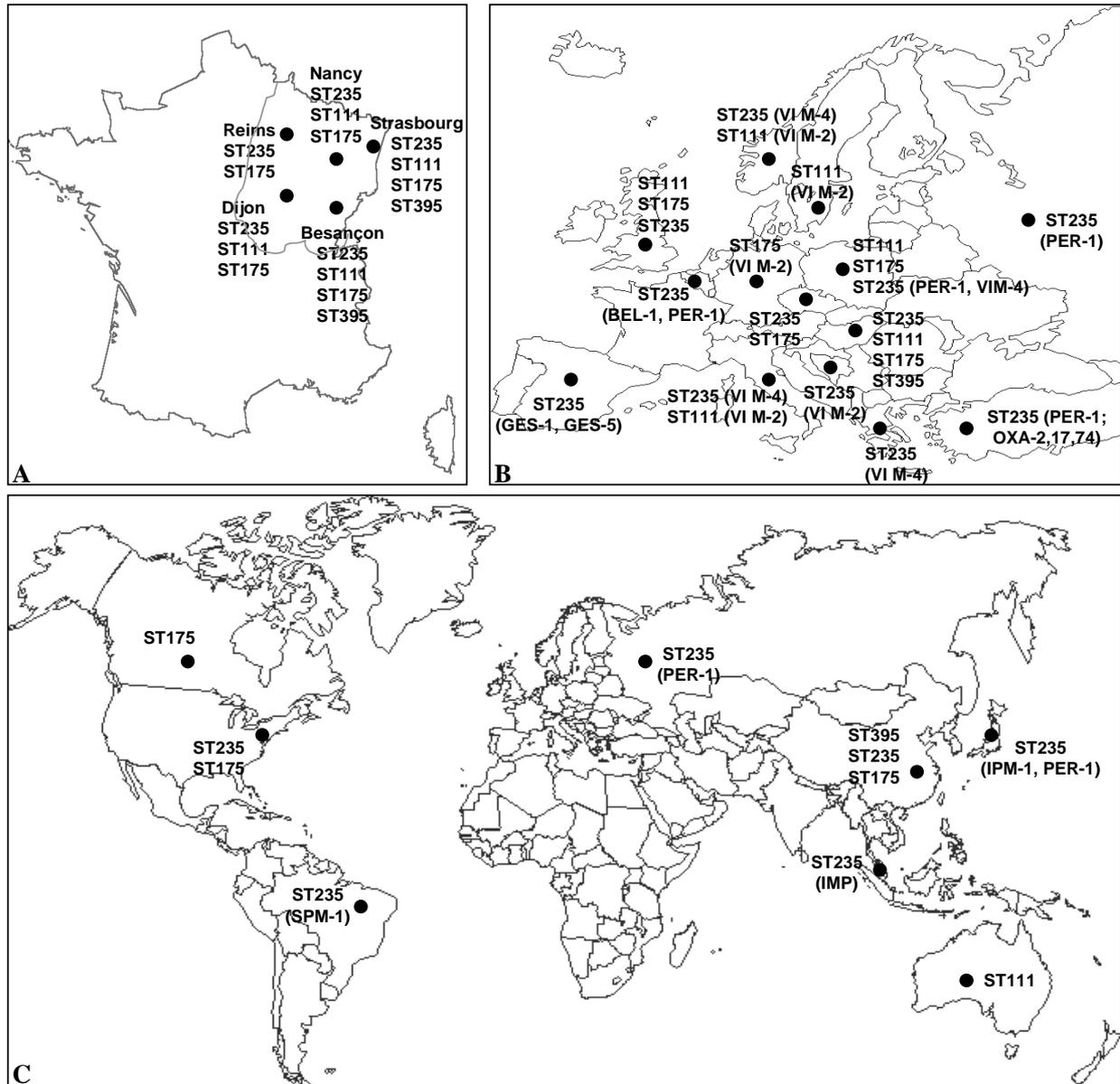


Figure 2: Distribution of epidemic lineage of *P. aeruginosa* in Eastern France (A, this study), Europe (B) and worldwide (C). For map B and C, the β -lactamase content was specified into the brackets if available.



Belgium: Glupczynski Y et al. J Antimicrob Chemother 2010 (19)
 Canada: Speert D et al. Am J Respir Crit Care Med 2002 ()
 Czech Republic: Nemecek A et al. Res Microbiol 2010 (31)
 Germany: Elias J et al. Clin Microbiol Infect 2010 (26)
 Greece: Samuelsen O et al. Antimicrob Agents Chemother 2010 (18)
 Hungary: Libisch B et al. FEMS Immunol Med Microbiol 2008 (22)
 Italy: Edalucci E et al. Clin Microbiol Infect 2008 (25)
 Japan: Kouda S et al. J Antimicrob Chemother 2009 (23)
 Norway: Samuelsen O et al. Antimicrob Agents Chemother 2010 (18)
 Poland: Empel J et al. J Clin Microbiol 2007 (16)

Serbia: Lepsanovic Z *et al.* Acta Microbiol. Immunol 2008 ()
Singapore: Koh T *et al.* J Clin Microbiol 2010 (21)
Spain: Viedma E *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2009 ()
 Juan C *et al.* J Antimicrob Chemother 2010 (20)
Sweden: Samuelsen O *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2010 (18)
Turkey: Empel J *et al.* J Clin Microbiol 2007 (16)
United Kingdom: Curran B *et al.* J Clin Microbiol 2004 (11)
United States: Johnson J *et al.* J Clin Microbiol 2007 (14)
Brazil, China, Russia: MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>)

7. Etude 7 – Modélisation multiniveau de la prévalence des patients infectés par *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de santé de l’Est de la France.

7.1. Présentation de l’étude

La question de la contribution respective des sources endogènes et exogènes dans l’acquisition de *Pseudomonas aeruginosa* par les patients reste controversée. Dans cette étude nous rapportons une approche méthodologique originale pour répondre à cette question.

Le but de cette étude était de déterminer la part des facteurs individuels et celle des facteurs collectifs associés aux infections à *P. aeruginosa* (cas) dans les établissements de santé (ES \geq 300 lits) de l’inter-région Est, infections identifiées à travers l’enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006.

Une analyse statistique a été réalisée utilisant des modèles de régression logistique multivariée multiniveau avec pour variable réponse la présence ou non d’une IAS à *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés. Ces modèles permettaient la prise en compte de la structure hiérarchique des données et l’investigation simultanée des facteurs associés à deux niveaux :

- niveau 1 (individuel/patient : l’âge, le sexe, le score de McCabe, le statut immunitaire, le type de service d’hospitalisation et les antécédents d’intervention chirurgicale récente) ;
- et niveau 2 (collectif/établissement de santé : la région, le type d’ES, le nombre de lits, les proportions de patients exposés à un dispositif invasif [sonde urinaire, cathéter vasculaire ou intubation/trachéotomie] ou sous traitement antibiotique).

Initialement, toutes les variables ont été testées en analyse univariée puis un modèle final a été construit par introduction des variables associées avec un $p < 0,20$ selon une procédure pas à pas ascendante. La modélisation multiniveau a été réalisée par la construction de cinq modèles consécutifs.

7.2. Résultats

Au total, 25533 patients issus de 51 ES (médiane = 376 patients ; extrêmes = 224-1964 patients) ont été inclus dans l'étude. La prévalence globale des cas était de 0,37% (médiane des ES = 0,25% ; extrêmes = 0-1,65%) correspondant à 94 cas pour 98 infections (dont 32% respiratoires, 32% urinaires et 15% peau/tissus mous ; 28% des souches de *P. aeruginosa* étaient résistantes à la ceftazidime).

La modélisation multiniveau révélait que moins de 14% de la variabilité totale de la prévalence (VPC) était expliquée par des différences entre les ES. Après ajustement sur les variables de niveau patient qui expliquaient 52% de la variance de niveau ES celle-ci devenait non significativement différente de zéro. Autrement dit, il n'y avait plus de différence significative entre les établissements de soins en ce qui concerne la variable réponse. En définitif, les paramètres associés significativement et positivement à la prévalence de cas étaient : un score de McCabe ≥ 1 , une hospitalisation en réanimation, une intervention chirurgicale récente, le sexe masculin et au niveau collectif : une prévalence élevée d'exposition à au moins un dispositif invasif ou aux antibiotiques anti-pyocyaniques, notamment les aminoglycosides.

7.3. Conclusion

Ainsi dans cette étude, l'effet de composition (caractéristiques des patients), beaucoup plus que l'effet contextuel (caractéristiques écologiques) explique la variabilité de la prévalence des patients infectés par *P. aeruginosa* dans les ES de de l'inter-région Est.

7.4. Texte de l'article

Multilevel modelling of the prevalence of hospitalized patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*

H. GBAGUIDI-HAORE^{1,2*}, P. CHOLLEY^{1,2}, C. RABAUD³, X. BERTRAND^{1,2}
AND D. TALON^{1,2,3}

¹ Service d'Hygiène Hospitalière et d'Épidémiologie Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, France

² UMR 6249 CNRS-Université de Franche-Comté, Besançon, France

³ CCLIN-Est, Nancy, France

(Accepted 19 July 2010)

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading nosocomial pathogens. The question of the respective contribution of endogenous and exogenous sources remains controversial. In this study, we shed new light on this issue by means of a multilevel logistic regression analysis which allowed a simultaneous investigation of factors associated with prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* at two levels: patient and healthcare facility (HCF) in the eastern regions of France. A total of 25 533 in-patients from 51 HCFs were included in the analysis. The overall prevalence was 0·37% (range 0–1·65%). Multilevel modelling estimated that <14% of total variability of the outcome variable was explained by differences between HCFs and that after adjusting for patient-level variables, which explained 52% of HCF-level variance, the latter became non-significantly different from zero. A compositional effect (patient factors), rather than a contextual effect (ecological factors), explains heterogeneity of the prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* in the eastern HCFs of France.

Key words: Antibiotic resistance, epidemiology, hospital-acquired (nosocomial) infections, modelling, *Pseudomonas*.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading pathogens responsible for healthcare-associated infections in hospitals worldwide [1]. In France, it was ranked third of nosocomial pathogens according to the 2006 national nosocomial infections (NIs) prevalence survey [2]. Its intrinsic resistance to various antimicrobial agents [3] as well as its ability to acquire additional

resistance mechanisms [4], make treatment of infections caused by this microorganism difficult [5]. *P. aeruginosa* is known to be a ubiquitous environmental opportunistic pathogen with on the one hand, an intermittent presence in normal human intestinal flora and on the other, causing intestinal colonization in up to 10% of hospitalized patients [6, 7]. Several studies, mainly in intensive care units (ICUs) have attempted to evaluate the respective contribution of endogenous *versus* exogenous sources of *P. aeruginosa* colonization or infection. This issue remains controversial. Indeed, some studies have argued for a major role (>80%) of endogenous flora of patients [8–10].

* Author for correspondence: Dr H. Gbaguidi-Haore, Service d'Hygiène Hospitalière et d'Épidémiologie Moléculaire, CHU Jean Minjot, 3 boulevard Fleming, 25030 Besançon, France. (Email: z2gbaguidihaore@chu-besancon.fr)

Conversely, other authors have shown that exogenous sources (other patients and the inanimate environment such as taps and sinks) via cross-transmission played a substantial role (up to 50%) in the acquisition of *P. aeruginosa* [11–14]. In the present study, we shed new light on this issue by means of a multilevel statistical approach. The aim of this work was to determine individual (patient)- and group (hospital)-level factors associated with prevalence of hospitalized patients infected with *P. aeruginosa*.

MATERIAL AND METHODS

Setting, period of study and data source

Data were from the 2006 national NIs point-prevalence survey for the eastern regions of France. These five regions (Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté, Lorraine) account for 8.5 million inhabitants corresponding to 14% of the French population. This point-prevalence survey was performed in 2006, on a single day in June by trained investigators. Data were collected regarding hospitalized patients and healthcare facilities (HCFs) by means of standardized questionnaires. The resulting database, for the eastern regions of France included 52 720 in-patients and 343 HCFs (representing 83% of hospitals eligible for this survey). Our study was limited to HCFs of at least 300 beds.

Outcome variable

The outcome variable was binary and indicated whether a given hospitalized patient had, on the day of the survey, a *P. aeruginosa* NI acquired during his hospitalization [> 48 h after admission, imported NIs (i.e. acquired in another hospital) were excluded]. Definitions of NIs were adapted from those of CDC [15], and McGeer *et al.* [16] for patients from long-term care facilities. Asymptomatic bacteriurias were excluded. Regarding antibiotic resistance, only data regarding ceftazidime resistance were collected (resistant or not).

Data structure

Individual-level variables: patient characteristics

At the patient level (the lowest level of data), the following characteristics were considered: age (converted in binary data; < 65 years or ≥ 65 years), sex (male/female), immunocompromised status (patient with a malignant haemopathy/metastatic cancer, or

having received immunosuppressive treatment, radiotherapy, or infected with human immunodeficiency virus with a CD4 count of < 500 cells/l; yes/no), McCabe score (0, non-fatal disease; 1, ultimately fatal disease; 2, rapidly fatal disease) [17], surgery during the previous month (yes/no), and type of hospitalization ward (medical, surgical, ICU, other).

Group-level variables: HCF/hospital characteristics

Regarding the HCF level, this study included the following variables: region (Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté, Lorraine), type (university, general, psychiatric, other), status (public/private) and number of beds (< 900 or ≥ 900 beds); this threshold was retained because it made a better fit of the data possible. Moreover, individual factors relating to an exposure, on the day of survey, to invasive devices [intravascular device, tracheal catheter and urinary catheter (within the 7 previous days)] and to antibiotic treatments were aggregated at the HCF level. In fact, we considered that the measure of exposure was biased at patient level for these extrinsic factors. Indeed, data about these type of exposures were collected only for the day of the survey (except for the urinary catheter) and nothing was recorded regarding chronology of exposure in relation to infection. Thus, exposures to invasive devices were taken into account as proportions (%) of patients exposed to at least one invasive device, intravascular device, tracheal catheter and urinary catheter. Similarly, exposures to antibiotic agents were taken into account as proportions of patients exposed to antibiotic treatments, antipseudomonal antibiotics, non-antipseudomonal antibiotics, penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, quinolones, macrolides and other classes of antibiotics. In addition, HCFs were divided into two categories using the median as cut point for each of the proportions mentioned above. In this study, antipseudomonal antibiotics correspond to the following drugs: ticarcillin \pm clavulanic acid, piperacillin \pm tazobactam, some third-generation cephalosporins (ceftazidime, cefsulodine), all the fourth-generation cephalosporins (e.g. cefepime, ceftipime), aztreonam, carbapenems (imipenem, meropenem), aminoglycosides, ciprofloxacin and colistin.

Statistical analysis

To take into account the hierarchical structure of data, patients hospitalized in HCFs, and the possibility of intra-HCF correlation regarding the probability of

being infected with *P. aeruginosa*, we used a two-level hierarchical logistic regression analysis. Initially, each independent variable was tested in a univariate analysis using Stata software, version 10 (Stata Corp., USA), and subsequently a final model was built by introducing variables with $P < 0.20$ in the univariate analysis. The model building used a forward stepwise selection process. Five consecutive multilevel models were fitted to the data. Model 1 (unconditional, baseline), which included only the constant (i.e. no explanatory variables) was assessed in order to determine the initial distribution of the variance of the dependent variable between the two levels: the variance partition coefficient (VPC) was calculated using the Snijders & Bosker approximation [18, 19]:

$$\text{VPC} = \sigma_{u0}^2 / (\sigma_{u0}^2 + \pi^2/3),$$

where σ_{u0}^2 is the variance of the HCF-level random intercept and $\pi = 3.14159$. VPC is the proportion of total variance of the outcome that is explained at the HCF level. Furthermore, σ_{u0}^2 (HCF-level variance) represents the heterogeneity between HCFs in terms of the outcome. This heterogeneity can be explained by compositional effects (patient factors) and contextual effects (HCF factors). In model 2 (individual model), we entered patient-level variables and assessed whether any of the coefficients of any of the explanatory variables had a significant variance component between HCFs (heterogeneity of the effect across HCFs). In models 3a, 3b and 4 (final models) HCF-level variables were added. These final models differed in the way in which variables relating to invasive devices and antibiotic treatments were included: model 3a (i.e. ≥ 1 invasive device and ≥ 1 antibiotic treatment), model 3b (≥ 1 invasive device, ≥ 1 antipseudomonal antibiotic, ≥ 1 non-antipseudomonal antibiotic) and model 4 (each type of invasive devices and each class of antibiotics). Finally, we tested cross-level interactions (between patient- and HCF-level variables). The percentage of proportional change in variance (PCV) was calculated:

$$\frac{\sigma_{u0}^2(\text{model 2}) - \sigma_{u0}^2(\text{model 1})}{\sigma_{u0}^2(\text{model 1})} \times 100.$$

PCV represented the percentage of HCF-level variance (heterogeneity of HCFs) that was explained by variables retained in model 2 (i.e. patient-level variables). Significance of parameters was assessed with the Wald test. Modelling was performed using MLwiN

software, version 2.02 [20]. A P value < 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Overall prevalence

From the database source, 51 HCFs (≥ 300 beds) were included in the study corresponding to 26 249 in-patients. Because of missing values, only 25 533 in-patients (97.3%) were retained for analysis with a median number of 376 (range 224–1964) patients per HCF. The overall prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* was 0.37% (95% confidence interval 0.30–0.45) with a median prevalence of 0.25% (range 0–1.65) in HCFs. Prevalence was nil in 35% of HCFs. Overall, 94 patients were infected during their hospitalization for a total of 98 infections (28% of isolates were ceftazidime-resistant). Main sites of infection were respiratory tract (32%), urinary tract (32%) and skin/soft tissue (15%).

Univariate analyses, patients and HCF characteristics

In Table 1, we report characteristics of patients depending on whether they were infected or not with *P. aeruginosa*. Regarding HCFs, these were mainly general hospitals, which admitted almost half of patients, with public status and < 900 beds (Table 2). Other HCF characteristics including patients' data aggregated in relation to invasive devices and antibiotic treatments are shown in Table 2. Univariate analyses revealed on the one hand, that patient's age, region where the HCF was located, as well as its status, and high proportion (\geq median) of patients exposed to quinolones were not significantly associated with prevalence of cases. On the other hand, infected patients were significantly (Table 3) more often male with an immunocompromised status, a McCabe score ≥ 1 , a previous surgery, hospitalized in an ICU in a university hospital of at least 900 beds with a high proportion of patients exposed to invasive devices (intravascular device, tracheal catheter, urinary catheter) and antibiotic agents (all classes except quinolones).

Multilevel modelling

Results of multilevel modelling are presented in Table 4. First, model 1 (no explanatory variables, i.e. with only random intercept) revealed a significant

Table 1. Characteristics* of patients with and without *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) infection

Characteristic	No. (%) of patients	
	With <i>Pa</i> infection (<i>n</i> = 94)	Without <i>Pa</i> infection (<i>n</i> = 25 439)
Age \geq 65 years	56 (59.6)	13 806 (54.3)
Mean [standard deviation]	66.2 [18.9]	61.6 [24.9]
Median [interquartile range]	73.8 [54–80]	68 [45–82]
Male sex	59 (62.8)	11 535 (45.3)
Immunocompromised status	18 (19.2)	2587 (10.2)
McCabe score		
0 (non-fatal disease)	25 (26.6)	17 179 (67.5)
1 (ultimately fatal disease)	30 (31.9)	6037 (23.7)
2 (rapidly fatal disease)	39 (41.5)	2223 (8.8)
Previous surgery (within 1 month)	35 (37.2)	4499 (17.7)
Type of hospitalization ward		
Medical	34 (36.2)	8723 (34.3)
Surgical	17 (18.1)	5552 (21.8)
Intensive care unit	23 (24.4)	564 (2.2)
Other†	20 (21.3)	10 600 (41.7)

* $P < 0.05$ for all patient characteristics except age.

† Other: rehabilitation, long term-care and psychiatry.

heterogeneity of HCFs in term of prevalence of cases (σ_{ω}^2 , HCF-level variance was significantly different from zero). VPC was equal to 14% and represented the initial share of total variance (heterogeneity) of outcome variable attributable to HCF level. Second, after adjusting for patient-level variables (model 2, individual model), HCF-level variance decreased and became non-significantly different from zero, i.e. there was no more significant heterogeneity between HCFs. PCV was equal to 52% $[(0.533 - 0.258) \times 100 / 0.533]$. In other terms, patient-level variables retained in model 2 explained 52% of HCF-level variance. Moreover, VPC was equal to 7.3% in the adjusted model for patient-level variables. No significant random effect was detected regarding patient-level variables, i.e. effects (coefficients) of these variables did not significantly vary across HCFs. Third, the three final models showed that on the one hand the following patient-level variables were independently and positively associated with prevalence of cases: male sex ($P < 0.05$), McCabe score ≥ 1 ($P < 0.001$), a previous surgery ($P < 0.01$) and a hospitalization in ICU ($P < 0.001$). On the other hand, HCFs with a high proportion of patients exposed to invasive devices (model 3a, $P < 0.05$), antipseudomonal

antibiotics (model 3b, $P < 0.01$) and aminoglycosides (model 4, $P < 0.01$) were positively associated with outcome variable. Finally, the model-building process led to random-intercept and fixed-coefficient models (final models). No significant cross-level interaction was identified.

DISCUSSION

In this study, we tried by means of a complex statistical approach to shed new light on the respective contribution of patient- and ecological-level factors associated with *P. aeruginosa* infections. Thus, we used multilevel modelling in order to quantify higher-level variations (at HCF level), some of which could be explained by the heterogeneity of the effect of patient-level factors (across HCFs) and HCF-level factors. This statistical approach makes possible a simultaneous and appropriate analysis of patient- and HCF-level characteristics [21]. Indeed, the implementation of multilevel logistic regression models has the following advantages: the correction of underestimation of standard errors (due to clustered data), the examination of cross-level interactions, the estimation of the variability of coefficients at the HCF level, the determination of distribution of total variance of outcome variable between patient and HCF levels, and the analysis of contextual effects after adjusting for individual variables. The unconditional model (model 1) showed that 14% (VPC) of variability of the outcome variable was explained by differences between HCFs. After adjusting for patient-level variables (model 2), VPC was equal to 7.3% and residual variance (HCF-level variance) decreased and became non-significantly different from zero. This is an indication of a substantial compositional effect explaining the heterogeneity of the prevalence of cases in the HCFs in eastern of France. Moreover, at the patient level, factors significantly associated with prevalence of cases were consistent with those reported in previous studies [1, 22]. Furthermore, in the full model 3a, the proportion of patients exposed to 'invasive devices' was positively associated with the outcome variable after adjusting for patient factors (control for ecological bias). This can be interpreted as a significant association between the level of invasive procedures of the hospital and prevalence of cases. Similarly, proportions of patients exposed to 'antipseudomonal antibiotics' (model 3b) especially 'aminoglycosides' (model 4) were positively associated with outcome variable. These findings can be explained by the fact

Table 2. Characteristics of healthcare facilities (HCFs ≥ 300 beds): HCF-level factors

Characteristic	No. of hospitals (%) (n = 51)	No. of patients (%) (n = 25 533)	
Region			
Alsace	10 (19.6)	6303 (24.7)	
Bourgogne	12 (23.5)	4687 (18.3)	
Champagne-Ardenne	8 (15.7)	4306 (16.9)	
Franche-Comté	8 (15.7)	4075 (16.0)	
Lorraine	13 (25.5)	6162 (24.1)	
Type of hospital			
University	7 (13.7)	7665 (30.0)	
General	29 (56.9)	12 280 (48.1)	
Psychiatric	10 (19.6)	3941 (15.4)	
Other	5 (9.8)	1647 (6.5)	
Status			
Public	45 (88.2)	23 281 (91.2)	
Private	6 (11.8)	2252 (8.8)	
No. of beds			
< 900 beds	43 (84.3)	16 575 (64.9)	
≥ 900 beds	8 (15.7)	8958 (35.1)	
Proportion* (%) of patients exposed to	Minimum	Median (IQR)	Maximum
Invasive devices	0	30.0 (19.2–39.2)	50.0
● Intravascular device	0	24.6 (16.7–33.4)	43.9
● Tracheal catheter	0	1.2 (0–2.5)	5.4
● Urinary catheter	0	10.2 (5.5–12.8)	18.5
Antibiotic treatments	0.6	17.0 (11.1–21.5)	34.1
● Antipseudomonal antibiotics	0	2.7 (0.7–4.5)	8.3
● Non-antipseudomonal antibiotics	0.6	15.3 (10.7–19.5)	32.3
● Penicillins	0.2	7.9 (4.9–10.2)	17.2
● Cephalosporins	0	3.1 (1.6–5.0)	10.2
● Aminoglycosides	0	0.9 (0–1.7)	3.5
● Quinolones	0	5.0 (2.9–6.4)	10.8
● Macrolides	0	1.2 (0.6–1.8)	3.7
● Others	0	2.7 (1.5–4.4)	10.2

IQR, Interquartile range.

* Proportion (%) of patients exposed on the day of the survey to at least one invasive device [intravascular device, tracheal catheter or urinary catheter (within 7 previous days)], at least one antibiotic treatment.

that HCFs with higher prevalence of *P. aeruginosa* more often use antipseudomonal antibiotics. Another possible interpretation, which seems predominant, is that these HCFs are probably those with higher prevalence of multidrug-resistant strains. This hypothesis is sustained first by the significant and positive association ($P=0.021$) between a high prevalence of patients infected with ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* and a high proportion of patients exposed to ceftazidime in HCFs. Second, when we included a binary variable at the HCF level 'high vs. low prevalence of patients infected with *P. aeruginosa*' in final models (not shown), a high proportions of patients exposed to antipseudomonal antibiotics,

aminoglycosides and invasive devices remained significantly and positively associated with outcome. These variables regarding antibiotic exposures can be considered as estimations of antibiotic selective pressure which provides *P. aeruginosa* with a selective growth advantage. Several individual-level studies demonstrated a significant and positive association between exposure to some antipseudomonal agents especially aminoglycosides and acquisition of *P. aeruginosa* [9, 23–25]. In our study, this association involving aggregated data at the HCF level could simply be the reflection of the association identified at the patient level. The present study has several limitations. First, data are from a cross-sectional study

Table 3. Univariate analyses of patient- and healthcare facility (HCF)-level factors associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection

Characteristic	OR (95% CI)	P
Patient level		
Age \geq 65 years	1.23 (0.71–2.11)	0.368
Male sex	2.02 (1.29–3.15)	0.002
Immunocompromised status	1.88 (1.09–3.27)	0.024
McCabe score		
0 (non-fatal disease)	Reference	—
1 (ultimately fatal disease)	3.34 (1.90–5.88)	< 0.001
2 (rapidly fatal disease)	11.79 (6.89–20.17)	< 0.001
Previous surgery (within 1 month)	2.47 (1.57–3.87)	< 0.001
Hospitalization in ICU	12.76 (7.65–21.28)	< 0.001
HCF level		
Region		
Alsace	Reference	—
Bourgogne	1.56 (0.55–4.45)	0.402
Champagne-Ardenne	2.02 (0.68–5.97)	0.205
Franche-Comté	1.94 (0.66–5.70)	0.225
Lorraine	1.01 (0.35–2.96)	1.0
Type of hospital		
University	Reference	—
General	0.70 (0.38–1.30)	0.258
Psychiatric	0.14 (0.04–0.54)	0.004
Other	0.11 (0.01–0.98)	0.048
Status		
Public	Reference	—
Private	0.24 (0.05–1.29)	0.096
No. of beds		
< 900 beds	Reference	—
\geq 900 beds	2.07 (1.03–4.13)	0.041
Proportion (%) of patients exposed to*		
Invasive devices		
● Intravascular device	3.89 (1.92–7.89)	< 0.001
● Tracheal catheter	3.10 (1.59–6.03)	< 0.001
● Urinary catheter	3.66 (1.80–7.46)	< 0.001
● Antibiotic treatments	2.52 (1.30–4.89)	0.006
Antibiotic treatments		
● Antipseudomonal antibiotics	3.15 (1.58–6.27)	0.001
● Non-antipseudomonal antibiotics	4.16 (2.10–8.22)	< 0.001
● Penicillins	3.15 (1.59–6.22)	0.001
● Cephalosporins	2.66 (1.41–5.04)	0.003
● Aminoglycosides	3.00 (1.56–5.79)	0.001
● Quinolones	4.57 (2.34–8.92)	< 0.001
● Macrolides	1.45 (0.74–2.85)	0.278
● Others	2.69 (1.40–5.18)	0.003
● Others	2.42 (1.24–4.72)	0.010

OR, odds ratio; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit.

Bold values are significant.

* Odds ratios are reported for proportions higher than median.

(point prevalence survey). Thus, some findings, particularly the major role of compositional effect on the heterogeneity of HCFs for prevalence of infected patients with *P. aeruginosa*, should be confirmed using multilevel longitudinal studies. In addition, the outcome variable concerned infected patients, and not

the acquisition (colonized and/or infected patients) of *P. aeruginosa*. Second, available data did not allow us to determine the intermediate level between the patient level and the HCF level, i.e. a middle level such as the unit of hospitalization. The latter would make it possible to better understand and model the

Table 4. Multilevel logistic regression models of patient and healthcare facility (HCF) characteristics associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection [adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI)]

Parameter	Model 1†	Model 2‡	Model 3a†	Model 3b†	Model 4‡
	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
Fixed part					
Intercept (s.e.)	-5.96 (0.17)***	-7.26 (0.27)***	-7.77 (0.38)***	-7.83 (0.37)***	-7.91 (0.37)***
Patient level					
Male sex		1.66 (1.07-2.60)*	1.65 (1.06-2.56)*	1.65 (1.07-2.56)*	1.68 (1.08-2.60)*
McCabe score					
0 (non-fatal disease)		Reference	Reference	Reference	Reference
1 (ultimately fatal disease)		3.23 (1.84-5.66)***	3.08 (1.76-5.37)***	3.04 (1.75-5.28)***	2.98 (1.72-5.16)***
2 (rapidly fatal disease)		9.54 (5.52-16.48)***	8.87 (5.16-15.27)***	8.71 (5.08-14.92)***	8.69 (5.08-14.84)***
Previous surgery (within 1 month)		2.18 (1.37-3.48)**	2.04 (1.29-3.23)**	2.03 (1.29-3.21)**	2.01 (1.27-3.18)**
Hospitalization in ICU		5.82 (3.35-10.09)***	5.49 (3.19-9.45)***	5.61 (3.27-9.61)***	5.72 (3.34-9.79)***
HCF level					
Proportion (%) of patients exposed to					
Invasive devices			2.30 (1.13-4.68)*		
Antipseudomonal antibiotics				2.59 (1.30-5.15)**	2.92 (1.49-5.75)**
Aminoglycosides					
Random part					
$\sigma_{\delta_0}^2$: HCF-level variance (s.e.)	0.533 (0.264)*	0.258 (0.178) n.s.	0.204 (0.157) n.s.	0.143 (0.133) n.s.	0.117 (0.123) n.s.
VPC‡	14%	7.3%	5.8%	4.2%	3.4%
PCV§		52%	62%	73%	78%

ICU, Intensive care unit; n.s., non-significant; s.e.: standard error.
 † The model-building strategy used a forward stepwise selection process of patient- and HCF-level factors. Model 1 (unconditional model): without covariates, baseline. Model 2 (individual model): includes only patient-level variables. Three final models: model 3a (includes invasive devices and antibiotic treatments on the whole), model 3b (includes invasive devices on the whole and antipseudomonal/non-antipseudomonal antibiotics) and model 4 [includes separately each type of invasive devices (intravascular device, tracheal catheter, urinary catheter) and each class of antibiotics (penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, quinolones, macrolides and others)].
 ‡ VPC: variance partition coefficient (%), [calculated using Snijders & Bosker approximation, $\sigma_{\delta_0}^2/(\sigma_{\delta_0}^2 + \pi^2/3)$].
 § PCV: proportional change in variance (%), $[(\sigma_{\delta_0}^2(\text{model 2}) - \sigma_{\delta_0}^2(\text{model 1}) \times 100)/\sigma_{\delta_0}^2(\text{model 1})]$, for model 2 in this case.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (P values are from Wald χ^2 test).

patients' close environment (i.e. other patients, health-care workers and inanimate hospital environment). Only the type of hospitalization ward was known and the variable 'hospitalization in ICU' which characterizes a diagnostic as well as this middle level was collapsed to patient level. However, no significant random effect at HCF level was identified with this factor. In other terms, the coefficient of the variable 'hospitalization in ICU' did not significantly vary across HCFs (33/51 HCFs had at least one ICU). Moreover, this variable was potentially biased because in some cases, patients can be admitted to the ICU as a consequence of a severe *P. aeruginosa* infection. Third, no data were available to assess some contextual effects that could modify the risk of cross-transmission such as colonization pressure (other patients colonized by *P. aeruginosa* or contamination of hospital environment) and nurse-to-patient ratio. These unobserved variables are part of the unexplained heterogeneity between HCFs. Fourth, some individual variables were not taken into account or were included as aggregated data at HCF level, for previously stated reasons. Indeed, some invasive devices (endotracheal tube, central venous catheter) are risk factors for *P. aeruginosa* infections [1, 22] and can illustrate the severity of underlying illness. However, these exposures were collected only for the day of the survey (except for the urinary catheter) and nothing was recorded regarding the chronology of exposure in relation to infection. This means, that it was impossible to unequivocally characterize the association of these exposures with the outcome; 'possible cause or consequence'. This work was limited to HCFs with at least 300 beds. This restriction was informed by findings from Moineddin *et al.* [26] who recommended for low prevalence events (<10%) at least 50 groups with group size (i.e. no. of individuals per group) adjusted such that the expected number of events in each group should be >1. In our study, we tried to comply with this recommendation. To our knowledge, this is the first study which investigates, at two levels (patient and HCF), factors associated with *P. aeruginosa* infection using a multilevel statistical approach.

In conclusion, multilevel analysis results suggest that a compositional effect (patient factors) rather than a contextual effect (ecological factors) explains the heterogeneity of the prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* in HCFs in the eastern regions of France. This finding is in line with studies that advocate a major role of endogenous flora in *P. aeruginosa* infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the French hospitals that contributed to data collection and the nosocomial infections surveillance network of eastern regions of France [CCLIN-Est (Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Est de la France)].

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Morrison AJ Jr., Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases* 1984; 6 (Suppl. 3): S627–642.
2. The French Nosocomial Infections Surveillance Network (RAISIN). The national prevalence survey of nosocomial infections, France, June 2006 [in French]. Saint-Maurice, France: Institut de Veille Sanitaire, 2009.
3. Mesaros N, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infections* 2007; 13: 560–578.
4. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58: 1133–1148.
5. Vettoretti L, *et al.* Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009; 28: 1217–1222.
6. Murthy SK, *et al.* Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 35–40.
7. Blanc DS, Francioli P, Zanetti G. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units – a review. *Open Microbiology Journal* 2007; 1: 8–11.
8. Berthelot P, *et al.* Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Medicine* 2001; 27: 503–512.
9. Bonten MJ, *et al.* Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 160: 1212–1219.
10. Speijer H, *et al.* Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 3654–3661.
11. Bergmans DC, *et al.* Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998; 53: 1053–1058.

12. **Bertrand X, et al.** Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Medicine* 2001; **27**: 1263–1268.
13. **Blanc DS, et al.** Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Medicine* 2004; **30**: 1964–1968.
14. **Reuter S, et al.** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Critical Care Medicine* 2002; **30**: 2222–2228.
15. **Garner JS, et al.** CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American Journal of Infection Control* 1988; **16**: 128–140.
16. **McGeer A, et al.** Definitions of infection for surveillance in long-term care facilities. *American Journal of Infection Control* 1991; **19**: 1–7.
17. **McCabe WR, Jackson GG.** Gram-negative bacteremia I. Etiology and ecology. *Archives of Internal Medicine* 1962; **110**: 847–855.
18. **Goldstein H.** *Multilevel Statistical Models*, 3rd edn. London: E. Arnold, 2003.
19. **Snijders T, Bosker R.** *Multilevel Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Multilevel Modelling*. London: Sage, 1999.
20. **Rasbash J, et al.** MLwiN Version 2.02. Bristol, UK: Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol, 2005.
21. **Diez Roux AV, Aiello AE.** Multilevel analysis of infectious diseases. *Journal of Infectious Diseases* 2005; **191** (Suppl. 1): S25–33.
22. **Cross AS.** Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *European Journal of Clinical Microbiology* 1985; **4**: 156–159.
23. **Martinez JA, et al.** Influence of antipseudomonal agents on *Pseudomonas aeruginosa* colonization and acquisition of resistance in critically ill medical patients. *Intensive Care Medicine* 2009; **35**: 439–447.
24. **Aloush V, et al.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**: 43–48.
25. **Fortaleza CM, et al.** Risk factors for recovery of imipenem- or ceftazidime-resistant *pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to a teaching hospital in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006; **27**: 901–906.
26. **Moineddin R, Matheson FI, Glazier RH.** A simulation study of sample size for multilevel logistic regression models. *BMC Medical Research Methodology* 2007; **7**: 34.

Conclusion et perspectives

Le bacille pyocyanique est une bactérie de l'environnement mais peut être commensal du tube digestif. Pour les sujets en bonne santé, *P. aeruginosa* est peu présent, avec seulement 2 à 10% de porteurs tandis que chez les sujets hospitalisés ce taux peut atteindre 50%, voire 60% sur les plaies de brûlures ou d'escarres (3). Depuis l'émergence de cette espèce en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Le plus souvent les investigations menées au décours de ces épidémies identifiaient l'environnement hydrique des services comme réservoir principal de contamination des patients. Saprophyte des environnements hydriques, *P. aeruginosa* peut en effet survivre et se multiplier sur des supports inertes humides (lavabos, robinets, savons, nébulisateurs et humidificateurs des appareils de ventilation), voire des solutions antiseptiques conservées trop longtemps (ammoniums quaternaires, chlorhexidine).

De plus les études disponibles montrent très majoritairement que les infections à *P. aeruginosa* acquises en réanimation sont des infections tardives (survenant plus de 5 jours après l'admission) présument ainsi de l'acquisition de la souche dans le service considéré (106, 174). Ainsi, à travers ces observations, les professionnels de l'hygiène ont une image univoque de l'épidémiologie hospitalière de *P. aeruginosa* : pathogène opportuniste, il est responsable de grandes épidémies cataclysmiques chez les patients fragiles contaminés *via* le réseau d'eau de l'hôpital qui héberge ces clones épidémiques souvent multirésistants aux antibiotiques.

Pourtant, d'une part, le délai de survenue de l'infection ne préjuge pas nécessairement de l'origine de la souche infectante (réservoir et voie de transmission) et, d'autre part, la présence concomitante de cette espèce au niveau de l'environnement des services et au niveau des patients n'est pas suffisante pour affirmer le rôle de réservoir majeur de l'environnement dans la survenue des cas d'infections (81, 98). En effet l'identité des souches environnementales et des souches cliniques doit être démontrée. De plus, la présence éventuelle des souches cliniques dans l'environnement immédiat des patients peut être la conséquence de la colonisation du patient (à travers le transport et l'élimination de divers déchets biologiques du patient) plutôt que d'être la source de contamination de ceux-ci.

La consultation régulière de la liste de discussion 'Nosobase' permet de se convaincre de la priorité absolue accordée par les hygiénistes de tout bord à la maîtrise de la contamination de l'eau devant une augmentation de l'incidence des infections à *Pseudomonas aeruginosa* dans un service de réanimation.

D'ailleurs les dernières recommandations nationales relatives à la prévention de la transmission croisée apparaissent très en retrait sur la place du dépistage de *P. aeruginosa* à l'admission en réanimation ou en cours de séjour et donc sur la place des précautions complémentaires par rapport à l'importance accordée au dépistage et aux précautions complémentaires pour la maîtrise du staphylocoque doré résistant à la méticilline (136). Ces recommandations limitent les indications de ces mesures aux seules situations épidémiques identifiées et liées à des souches résistantes.

La technique de Multi Locus Sequence Typing (MLST) permet l'étude de l'évolution phylogénétique de nombreuses espèces bactériennes comme *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Staphylococcus aureus* (166-168). C'est une nouvelle approche moléculaire dérivée de l'électrophorèse des isoenzymes. Le MLST est basé sur le séquençage de 5 à 10 gènes de ménage «house keeping genes», importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques de chaque espèce. Pour *P. aeruginosa*, la technique de MLST a été développée et mise au point par Curran et *al.* en 2004 (169), puis modifiée par van Mansfeld R et *al.* en 2009 (170), ce travail tient lieu de référence dans l'étude de cette bactérie. Elle est basée sur l'analyse par séquençage nucléotidique du polymorphisme de 7 gènes domestiques répartis sur le chromosome bactérien et conservés au cours de l'évolution. Les résultats des études basées sur cette nouvelle approche sont concordants et montrent que quelques clones appartenant à des types MLST bien définis et très épidémiques sont plus susceptibles d'acquérir de la résistance sous l'effet de la pression antibiotique. Ainsi du point de vue macro-épidémiologique, l'hypothèse d'une population panmictique (n'importe quelle souche peut devenir résistante puis épidémique dans un environnement très sélectif du point de vue de l'usage des antibiotiques) est remise en cause et il est plus probable aujourd'hui que la capacité de diffusion d'un clone détermine sa capacité à acquérir des résistances nouvelles (34, 175-181).

L'oligoclonalité des souches est maintenant bien confirmée : sur une incidence de base de patients présentant une infection au cours de leur hospitalisation liée à une souche d'origine endogène, l'incidence de base variant en fonction du recrutement des patients vient se surajouter des cas d'origine exogène liés à des souches épidémiques ou micro-épidémiques acquises en réanimation, l'incidence de ces derniers variant dans le temps et dans l'espace mais représentant globalement en moyenne 50% du total des cas (103, 104, 117, 132).

Les investigations menées dans l'environnement hydrique des services d'hospitalisation au moment de l'identification d'un phénomène épidémique ne peuvent suffire à clarifier le rôle de celui-ci dans la survenue de l'épidémie. Indépendamment de la situation épidémiologique, qui peut varier d'un service à un autre et selon la période, la mesure de la fréquence de contamination des patients par l'environnement hydrique impose trois conditions méthodologiques qui sont rarement réunies (2) :

- l'identification de l'ensemble des patients colonisés/infectés passe par la réalisation de prélèvements à visée épidémiologique chez les patients
- les prélèvements des points d'eau doivent être généralisés et réalisés de façon régulière pour 'encadrer' la date de début de positivité des patients
- la comparaison des souches doit reposer sur une méthode de typage possédant à la fois une bonne reproductibilité et un fort pouvoir discriminant, de ce point de vue le profil de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé apparaît comme le 'Gold Standard' (110, 163)

Des quelques études prospectives disponibles ayant mise en œuvre ces trois principes méthodologiques, il ressort aujourd'hui que si le rôle de l'environnement hydrique du service joue un rôle indiscutable dans le risque d'acquisition d'une souche de *P. aeruginosa*, celui-ci est très surévalué puisqu'en moyenne seulement 20% des acquisitions seraient d'origine hydrique (1, 81, 103, 106).

Bien que la surveillance des infections à *P. aeruginosa* en réanimation soit recommandée, peu d'informations sont disponibles car les études disponibles sont principalement centrées sur la résistance de cette bactérie aux antibiotiques. Il est par ailleurs difficile de comparer les taux d'incidence entre hôpitaux et services. En effet les différences observées peuvent être liées à des différences dues aux patients pris en charge (pathologies motivant l'hospitalisation et gravité), au mode de prise en charge (invasivité des soins), à la pression antibiotique exercée ainsi qu'à l'observance des mesures d'hygiène. Approximativement 1% des patients présente une infection à *P. aeruginosa* au moment de leur admission en réanimation. Ce taux tend à augmenter avec la durée d'hospitalisation, pouvant atteindre 3%, 6,9% et même 10%. Les données Réa-Raisin 2007, incluant 22927 patients rapportent un taux moyen d'infectés de 14,4%, *P. aeruginosa* étant impliqué dans 15,5% de l'ensemble des infections, soit 2,2% de patients infectés à *P. aeruginosa*.

Cependant les seuls prélèvements cliniques ne permettent pas de visualiser l'image épidémiologique globale de *P. aeruginosa* et les prélèvements épidémiologiques sont indispensables pour caractériser le niveau d'endémicité de cette espèce bactérienne dans les services de réanimation.

Les études basées sur des prélèvements systématiques rapportent que de 2 à 13% des patients sont colonisés à l'admission et que ce taux peut atteindre 15% voire 44% durant l'hospitalisation. Dans une étude récente, sous presse, nous avons montré que dans notre CHU pour un patient positif à *Pseudomonas aeruginosa* identifié par un prélèvement à visée diagnostique, il y avait 2 à 3 patients positifs non identifiés en l'absence de prélèvements de dépistage. Sur ces données, il apparaît que l'épidémiologie en réanimation de *Pseudomonas aeruginosa* n'était pas si différente de celle du staphylocoque doré résistant à la méticilline (SAMR), les infectés représentant la seule partie émergée de l'iceberg, la partie immergée n'étant mesurable qu'à travers le dépistage.

De plus nous avons pu montrer aussi l'apport des prélèvements à visée épidémiologique dans l'identification de l'ampleur de la multirésistance aux antibiotiques puisque c'est à travers ces prélèvements systématiques que plus d'un tiers des patients colonisé/infecté par une souche multirésistante avait été détecté. Cette dernière étude suggère d'ailleurs que les souches multirésistantes émergent principalement parmi des clones de *P. aeruginosa* endémiques moins résistants qui diffusent au sein de notre hôpital par transmission croisée (100-103, 106, 110).

Conclusion

Les données épidémiologiques acquises sur *Pseudomonas aeruginosa* dans les services de réanimation depuis quelques années bouleversent l'image univoque ancrée dans les esprits. Le rôle potentiel de l'environnement hydrique comme réservoir de contamination des patients est confirmé mais sa part réelle dans l'acquisition des souches en réanimation était clairement surévaluée. Les données complémentaires sur le statut de cette espèce qui apparaît maintenant comme un commensal opportuniste et non plus seulement comme un saprophyte de l'environnement, sur la fréquence du portage chez des patients non infectés et la probable transmission directe fréquente de patient à patient rapprochent cette espèce, du fait aussi de sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, aux autres pathogènes hospitaliers multirésistants aux antibiotiques dénommés sous la terminologie 'BMR'.

En tant que 'BMR' n'est-il pas temps de tester l'efficacité d'une stratégie globale de prévention des infections qui a fait ses preuves dans la gestion du SAMR avec dépistage et application de précautions complémentaires aux précautions standard ?

Références bibliographiques

1. Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. Arch Med Res. 2004 May-Jun;35(3):251-7.
2. Floret N, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. [Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Exogenous or endogenous origin of this bacterium?]. Pathol Biol (Paris). 2009 Feb;57(1):9-12.
3. Talon D. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. J Hosp Infect. 1999 Sep;43(1):13-7.
4. Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. [*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. Ann Fr Anesth Reanim. 2003 Jun;22(6):505-9.
5. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. Am J Infect Control. 2005 Jun;33(5 Suppl 1):S41-9.
6. Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, Thornley PE, Pattemore PK, Grimwood K. Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother. 1996 Jun;37(6):1155-64.
7. Becq F. [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis]. Arch Pediatr. 2003 Sep;10 Suppl 2:325s-32s.
8. Bert F, Lambert-Zechovsky N. Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. J Antimicrob Chemother. 1996 Apr;37(4):809-13.
9. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2004 Jan;10(1):12-26.

10. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):557-84.
11. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(12):3322-7.
12. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Jun;13(6):560-78.
13. McGowan JE, Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control.* 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S29-37; discussion S64-73.
14. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Nov;46(11):3406-11.
15. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1211-33.
16. Lodge J, Busby S, Piddock L. Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Aug 1;111(2-3):315-20.
17. Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2113-20.

18. Juan C, Moya B, Perez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May;50(5):1780-7.
19. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009 Sep;58(Pt 9):1133-48.
20. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Jul;50(1):11-8.
21. Sanschagrín F, Bejaoui N, Levesque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Aug;42(8):1966-72.
22. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Aug;47(8):2385-92.
23. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Aug;42(2):128-31.
24. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
25. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Jun;8(6):321-31.
26. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2859-63.

27. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Nov;40(11):2488-93.
28. Poirel L, Ronco E, Naas T, Nordmann P. Extended-spectrum b-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5(10):651-2.
29. Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3624-6.
30. Marchandin H, Jean-Pierre H, De Champs C, Sirot D, Darbas H, Perigault PF, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):213-6.
31. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May;43(5):1281-4.
32. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Dec;48(6):839-52.
33. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Jan;38(1):104-14.
34. Koh TH, Wang GC, Sng LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5378-80.
35. Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4309-15.

36. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Nov;50(5):673-9.
37. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec;48(12):4654-61.
38. Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jun;50(6):2272-3.
39. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Mar;47(3):247-50.
40. Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Dec;46(6):885-93.
41. Pai H, Kim J, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb;45(2):480-4.
42. Nordmann P. [Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2003 Jun;22(6):527-30.
43. Normark S. beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb Drug Resist.* 1995 Summer;1(2):111-4.
44. Liao X, Hancock RE. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa pbpB* gene encoding penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Aug;39(8):1871-4.

45. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem.* 1998 Oct 16;273(42):27668-77.
46. Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Jun;34(6):1273-5.
47. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr;7(2):337-41.
48. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Aug;45(8):2263-8.
49. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):710-2.
50. Mouneimne H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jan;43(1):62-6.
51. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 May;21(5):409-13.
52. Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Oct;48(4):553-5.
53. Kohler T, Epp SF, Curty LK, Pechere JC. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6300-5.

54. Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2000 Nov 1;192(1):107-12.
55. Sobel ML, Hocquet D, Cao L, Plesiat P, Poole K. Mutations in *PA3574 (nalD)* lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1782-6.
56. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):430-50.
57. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. Curr Opin Microbiol. 1999 Oct;2(5):499-503.
58. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb;49(2):479-87.
59. Zeng L, Jin S. *aph(3')-IIIb*, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Dec;47(12):3867-76.
60. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirk JE, et al. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. J Infect Dis. 2000 Mar;181(3):1180-4.
61. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. Clin Infect Dis. 1997 Jan;24 Suppl 1:S46-62.

62. Evans DJ, Pier GB, Coyne MJ, Jr., Goldberg JB. The *rfb* locus from *Pseudomonas aeruginosa* strain PA103 promotes the expression of O antigen by both LPS-rough and LPS-smooth isolates from cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol.* 1994 Aug;13(3):427-34.
63. Goldberg JB, Hatano K, Meluleni GS, Pier GB. Cloning and surface expression of *Pseudomonas aeruginosa* O antigen in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):10716-20.
64. Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun.* 1983 Oct;42(1):170-7.
65. Bryan LE, O'Hara K, Wong S. Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984 Aug;26(2):250-5.
66. Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plesiat P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1676-80.
67. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1797-802.
68. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 1;45(1):88-94.
69. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 2003 Dec 6;362(9399):1888-93.

70. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Bottger EC, Sander P. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Oct;45(10):2877-84.
71. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* 2000 Sep 21;407(6802):340-8.
72. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology.* 2000 Oct;146 (Pt 10):2543-54.
73. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7907-12.
74. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Apr;27(4):619-24.
75. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005 Aug 25;436(7054):1171-5.
76. Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988 Apr;32(4):518-23.
77. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* 2001 Sep;183(18):5395-401.
78. Kominos SD, Copeland CE, Grosiak B, Postic B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl Microbiol.* 1972 Oct;24(4):567-70.

79. Blanc DS, Nahimana I, Petignat C, Wenger A, Bille J, Francioli P. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004 Oct;30(10):1964-8.
80. Lasheras A, Guisset O, Boulestreau H, Rogues AM, Fiore M, Szajner S, et al. [Reservoirs and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit]. *Med Mal Infect.* 2006 Feb;36(2):99-104.
81. Cholley P, Thouverez M, Floret N, Bertrand X, Talon D. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* 2008 Aug;34(8):1428-33.
82. Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V, Ruhnke M. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001 Jan;22(1):49-52.
83. Trautmann M, Bauer C, Schumann C, Hahn P, Hoher M, Haller M, et al. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health.* 2006 Jul;209(4):325-31.
84. Sorin M, Segal-Maurer S, Mariano N, Urban C, Combest A, Rahal JJ. Nosocomial transmission of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* following bronchoscopy associated with improper connection to the Steris System 1 processor. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001 Jul;22(7):409-13.
85. Schelenz S, French G. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of bronchoscopes and an endoscope washer-disinfector. *J Hosp Infect.* 2000 Sep;46(1):23-30.
86. Struelens MJ, Rost F, Deplano A, Maas A, Schwam V, Serruys E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med.* 1993 Nov;95(5):489-98.

87. Cobben NA, Drent M, Jonkers M, Wouters EF, Vaneechoutte M, Stobberingh EE. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect.* 1996 May;33(1):63-70.
88. Wang SA, Levine RB, Carson LA, Arduino MJ, Killar T, Grillo FG, et al. An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999 Nov;20(11):746-51.
89. Yardy GW, Cox RA. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contaminated urodynamic equipment. *J Hosp Infect.* 2001 Jan;47(1):60-3.
90. Garland SM, Mackay S, Tabrizi S, Jacobs S. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with a contaminated blood-gas analyser in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1996 Jun;33(2):145-51.
91. Berrouane YF, McNutt LA, Buschelman BJ, Rhomberg PR, Sanford MD, Hollis RJ, et al. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated drain in a whirlpool bathtub. *Clin Infect Dis.* 2000 Dec;31(6):1331-7.
92. Muyldermans G, de Smet F, Pierard D, Steenssens L, Stevens D, Bougateg A, et al. Neonatal infections with *Pseudomonas aeruginosa* associated with a water-bath used to thaw fresh frozen plasma. *J Hosp Infect.* 1998 Aug;39(4):309-14.
93. Moolenaar RL, Crutcher JM, San Joaquin VH, Sewell LV, Hutwagner LC, Carson LA, et al. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000 Feb;21(2):80-5.
94. McNeil SA, Nordstrom-Lerner L, Malani PN, Zervos M, Kauffman CA. Outbreak of sternal surgical site infections due to *Pseudomonas aeruginosa* traced to a scrub nurse with onychomycosis. *Clin Infect Dis.* 2001 Aug 1;33(3):317-23.
95. Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Current therapies for *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Clin.* 2008 Apr;24(2):261-78.

96. Bertrand X, Bailly P, Blasco G, Balvay P, Boillot A, Talon D. Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. Clin Infect Dis. 2000 Oct;31(4):E9-E14.
97. Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006. Saint-Maurice (France): Institut de veille sanitaire; 2009.
98. Talon D, Thouverez M, Bertrand X. Nosocomial infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Hygiènes. 2007:1-10.
99. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006. Institut de veille sanitaire (InVS). [Consulté le 20/04/2010]. Disponible sur:
<http://www.invs.sante.fr/surveillance/enp2006/resultats.htm>.
100. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. Intensive Care Med. 2001 Aug;27(8):1263-8.
101. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospe R, Venet C, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. Intensive Care Med. 2001 Mar;27(3):503-12.
102. Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, et al. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. Thorax. 1998 Dec;53(12):1053-8.
103. Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Oct;160(4):1212-9.
104. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmoniere P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. J Hosp Infect. 2003 Apr;53(4):274-82.

105. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*. 1998 May;4(5):242-7.
106. Talon D, Mulin B, Rouget C, Bailly P, Thouverez M, Viel JF. Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):978-84.
107. Beyersmann J, Gastmeier P, Grundmann H, Barwolff S, Geffers C, Behnke M, et al. Transmission-associated nosocomial infections: prolongation of intensive care unit stay and risk factor analysis using multistate models. *Am J Infect Control*. 2008 Mar;36(2):98-103.
108. Baddour LM, Hicks DV, Tayidi MM, Roberts SK, Walker E, Smith RJ, et al. Risk factor assessment for the acquisition of fluoroquinolone-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a community-based hospital. *Microb Drug Resist*. 1995 Fall;1(3):219-22.
109. Rello J, Ausina V, Ricart M, Puzo C, Quintana E, Net A, et al. Risk factors for infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 1994;20(3):193-8.
110. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie JH. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3654-61.
111. Jones RN, Kirby JT, Beach ML, Biedenbach DJ, Pfaller MA. Geographic variations in activity of broad-spectrum beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Jul;43(3):239-43.
112. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2008
[Consulté le 10/01/2010]. Disponible sur:
http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf

113. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 2007.
[Consulté le 10/03/2008]. Disponible sur:
www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm_2007.pdf.
114. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'EST (C-CLIN EST). Surveillance des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques dans l'inter-région Est – Résultats 2009. 2010
[Consulté le 10/03/2010]. Disponible sur:
<http://cclin-est.fr/UserFiles/File/Surveillance/BMR/RAPPORT%20BMR%202009.pdf>.
115. Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May;59(5):1021-4.
116. Groupe d'étude de la résistance de *P. aeruginosa* aux bêtalactamines (GERPB). Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en France de 1994 à 1998. 2000.
117. Bertrand X, Thouverez M, Patry C, Balvay P, Talon D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Dec;7(12):706-8.
118. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5094-101.
119. Tsukayama DT, van Loon HJ, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit AC, van der Werken C, et al. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Oct;24(4):339-45.

120. Valles J, Mariscal D, Cortes P, Coll P, Villagra A, Diaz E, et al. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004 Sep;30(9):1768-75.
121. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32 Suppl 2:S146-55.
122. Ortega B, Groeneveld AB, Schultsz C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004 Oct;25(10):825-31.
123. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jun;43(6):1379-82.
124. Regnier B. [Bacteria, multiresistant to antibiotics, in intensive care units: epidemiological context and strategies of control]. *Pathol Biol (Paris).* 1996 Feb;44(2):113-23.
125. Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2002 Feb 1;34(3):340-5.
126. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis.* 1997 Nov;25(5):1094-8.
127. Paladino JA, Sunderlin JL, Forrest A, Schentag JJ. Characterization of the onset and consequences of pneumonia due to fluoroquinolone-susceptible or -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Sep;52(3):457-63.

128. Fink MP, Snyderman DR, Niederman MS, Leeper KV, Jr., Johnson RH, Heard SO, et al. Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. The Severe Pneumonia Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Mar;38(3):547-57.
129. Jourdain B, Novara A, Joly-Guillou ML, Dombret MC, Calvat S, Trouillet JL, et al. Role of quantitative cultures of endotracheal aspirates in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Jul;152(1):241-6.
130. Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC, Morris G, Kaye KS, Johnson JA. Risk factors for piperacillin-tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Mar;46(3):854-8.
131. El Amari EB, Chamot E, Auckenthaler R, Pechere JC, Van Delden C. Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Clin Infect Dis.* 2001 Dec 1;33(11):1859-64.
132. Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, et al. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis.* 2004 Mar 1;38(5):670-7.
133. Join-Lambert OF, Michea-Hamzehpour M, Kohler T, Chau F, Faurisson F, Dautrey S, et al. Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb;45(2):571-6.
134. Islam S, Oh H, Jalal S, Karpati F, Ciofu O, Hoiby N, et al. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jan;15(1):60-6.
135. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Nov;51(11):4062-70.

136. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH). Prévention de la transmission croisée: précautions complémentaires contact. 2009.

[Consulté le 20/05/2010]. Disponible sur:

http://www.sfhf.net/telechargement/recommandations_preventiontransmissioncroiseeSFHH.pdf

137. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J. Multi-resistance to antimicrobial agents for the ten most frequently isolated bacterial pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 Aug;18(2):147-60.

138. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol*. 2003 Mar;41(3):1192-202.

139. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3531-6.

140. Hocquet D, Bertrand X, Kohler T, Talon D, Plesiat P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jun;47(6):1887-94.

141. Wang CY, Jerng JS, Chen KY, Lee LN, Yu CJ, Hsueh PR, et al. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Jan;12(1):63-8.

142. Rello J, Mariscal D, March F, Jubert P, Sanchez F, Valles J, et al. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in ventilated patients: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):912-6.

143. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. J Clin Microbiol. 1998 May;36(5):1347-51.
144. Munck A, Sahler C, Briard M, Vidailhet M, Farriaux JP. [Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results]. Arch Pediatr. 2005 Jun;12(6):646-9.
145. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science. 1991 Jul 12;253(5016):202-5.
146. Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med. 1996 Jul 18;335(3):179-88.
147. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. Arch Pediatr. 2003 Sep;10 Suppl 2:342s-6s.
148. Saiman L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. Paediatr Respir Rev. 2007 Sep;8(3):249-55.
149. Islam S, Jalal S, Wretling B. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2004 Oct;10(10):877-83.
150. Bedos JP. [Therapeutic strategies for infections due to *Pseudomonas aeruginosa*]. Ann Fr Anesth Reanim. 2003 Jun;22(6):534-8.
151. Linden PK, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer DJ, Paterson D. Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2003 Dec 1;37(11):e154-60.
152. Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P. Précis de Bactériologie Clinique. 2ème édition, Editions ESKA, 2007.

153. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):2990-5.
154. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jul;48 Suppl 1:59-64.
155. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Oct;13 Suppl 3:1-46.
156. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
157. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
158. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
159. Egly JM, Mengus G, Monnet G, Revelant O. Electrophorèse en champs alternés de l'ADN. *Biofutur n°127, cahier n°61*; 1993.
160. Tumeo E, Gbaguidi-Haore H, Patry I, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int J Hyg Environ Health*. 2008 Mar;211(1-2):200-4.
161. Kayabas U, Bayraktar M, Otlu B, Ugras M, Ersoy Y, Bayindir Y, et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. *Am J Infect Control*. 2008 Feb;36(1):33-8.

162. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plesiat P, Talon D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Oct;28(10):1217-22.
163. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*. 1996 Feb;32(2):135-45.
164. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997 Jun;18(6):426-39.
165. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233-9.
166. Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, et al. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. *Trop Med Int Health*. 2008 Jan;13(1):31-40.
167. Thomas JC, Pettigrew MM. Multilocus sequence typing and pulsed field gel electrophoresis of otitis media causing pathogens. *Methods Mol Biol*. 2009;493:179-90.
168. Yan XM, Gu YX, He LH, Zhang HF, Zhang JZ. Multilocus sequence typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2009 Feb;43(2):137-40.
169. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5644-9.

170. van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, van Berkhout FT, Wolfs T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. J Clin Microbiol. 2009 Dec;47(12):4096-101.
171. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics. 2004 Jul 1;5:86.
172. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Res. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W728-33.
173. Fleiss J. Statistical methods for rates and proportions. 2e ed New York: John Wiley and Sons. 1981:14-5.
174. Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, Trouillet JL, Novara A, Gilbert C. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. JAMA.1996;275(11):866-869.
175. Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. J Clin Microbiol 2007 Sep;45(9):2829-2834.
176. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother 2010 Jan;54(1):346-352.
177. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother. 2010 May;65(5):866-71.

33. Juan C, Zamorano L, Mena A, Alberti S, Perez JL, Oliver A. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Mar;65(3):474-8.
178. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Dec;54(3):330-8.
179. Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jul;64(1):46-51.
180. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb;45(2):447-53.
181. Elias J, Schoen C, Heinze G, Valenza G, Gerharz E, Riedmiller H, et al. Nosocomial Outbreak of VIM-2 Metallo-Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Associated With Retrograde Urography. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Dec 23.

